BULLETIN du MUSÉUM NATIONAL d'HISTOIRE NATURELLE

PUBLICATION BIMESTRIELLE

sciences physico-chimiques

2

N° 177 JUILLET - AOUT 1973

BULLETIN
du
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

57, rue Cuvier, 75005 Paris

Le *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, revue bimestrielle, paraît depuis 1895 et publie des travaux originaux relatifs aux diverses branches de la Science.

Les tomes 1 à 34 (1895-1928), constituant la 1re série, et les tomes 35 à 42 (1929-1970), constituant la 2e série, étaient formés de fascicules regroupant des articles divers.

A partir de 1971, le *Bulletin* 3e série est divisé en six sections (Zoologie — Botanique — Sciences de la Terre — Sciences de l'Homme — Sciences physico-chimiques — Écologie générale) et les articles paraissent, en principe, par fascicules séparés.

S'adresser :

— pour les **échanges**, à la Bibliothèque centrale du Muséum national d'Histoire naturelle, 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris (C.C.P., Paris 9062-62) ;

— pour les **abonnements** et les **achats au numéro**, à la Librairie du Muséum 36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris (C.C.P., Paris 17591-12 — Crédit Lyonnais, agence Y-425) ;

— pour tout ce qui concerne la **rédaction**, au Secrétariat du *Bulletin*, 57, rue Cuvier, 75005 Paris.

Abonnements pour l'année 1973

ABONNEMENT GÉNÉRAL : France, 360 F ; Étranger, 396 F.

ZOOLOGIE : France, 250 F ; Étranger, 275 F.

SCIENCES DE LA TERRE : France, 60 F ; Étranger, 66 F.

ÉCOLOGIE GÉNÉRALE : France, 60 F ; Étranger, 66 F.

BOTANIQUE : France, 60 F ; Étranger, 66 F.

SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES : France, 15 F ; Étranger, 16 F.

International Standard Serial Number (ISSN) : 0027-4070.

BULLETIN DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
3e série, nº 177, juillet-août 1973, Sciences physico-chimiques 2

Biosynthèse et iodation des protéines thyroïdiennes chez quelques Vertébrés inférieurs. Sur l'existence de différences spécifiques des thyroglobulines [1]

par Andrée Brisson *

Abstract. — Molecular organization, amino acid composition, biosynthesis and iodination of the major thyroid protein, the thyroglobulin, from various lower Vertebrates were studied. The results fitted in with the hypothesis of the homology of this iodoprotein throughout all classes of Vertebrates; however, they pointed out some interspecies differences in the primary structure and physicochemical properties (sedimentation coefficient) of this macromolecule. On the other hand, the optimal biosynthesis of the thyroglobulin seemed to be in relation with the zone of thermal tolerance of each species studied.

SOMMAIRE

1. Thèse de doctorat ès Sciences naturelles, soutenue le 15 janvier 1973 à Paris.

* *Laboratoire de Physiologie générale et comparée, Muséum national d'Histoire naturelle ; Laboratoire d'Endocrinologie comparée associé au CNRS, 7, rue Cuvier, 75005 Paris.*

INTRODUCTION

L'homologie, au sens donné par Florkin (1962), de la fonction thyroïdienne dans la série phylétique des Vertébrés est établie grâce à divers critères d'ordre embryologique, morphologique et biochimique.

Le développement de la thyroïde à partir d'un diverticule du plancher du pharynx est uniforme chez les Vertébrés. Quel que soit l'aspect général ou l'état de dispersion de la thyroïde, la structure folliculaire de cette glande est mise en évidence à partir des Agnathes adultes (Eggert, 1938 ; Fontaine *et al.*, 1952) jusqu'aux Mammifères, et constitue l'unité morphologique de base de la thyroïde. Les hormones thyroïdiennes 3,5,3'-triiodothyronine et 3,5,3,5'-tétraiodothyronine ou thyroxine sont identifiées dans l'ensemble du phylum des Chordés, mais ne semblent pas exister en dehors de celui-ci (voir mises au point Leloup, 1964*a*, et Salvatore, 1969).

Phylum des chordés

- Chordés
  - **Urochordés** (ex : Ascidie)
  - **Céphalochordés** (ex : *Amphioxus*)
  - **Vertébrés**
    - Agnathes : Cyclostomes
    - Gnathostomes
      - Chondrichthyens
      - Ostéichthyens
      - Amphibiens
      - Reptiles
      - Oiseaux
      - Mammifères

Bien que les hormones thyroïdiennes soient mises en évidence dans l'endostyle des Céphalochordés (Barrington, 1959) et dans la tunique des Urochordés (voir mise au point Salvatore, 1969), ces structures, contrairement à la glande sous-pharyngienne des larves d'Agnathes, ne peuvent être considérées comme homologues de la thyroïde des Vertébrés.

La biosynthèse des iodothyronines n'est pas nécessairement liée à la structure folliculaire thyroïdienne, puisque celle-ci n'est pas observée chez les Céphalochordés, les Urochordés et les larves d'Agnathes. Elle aurait donc précédé dans l'évolution l'apparition de cette structure folliculaire.

Cependant, le fait même de l'existence des hormones thyroïdiennes chez tous les Chordés implique-t-il une identité dans les processus de formation des iodothyronines dans ce phylum ?

Les diverses étapes du métabolisme iodé intrathyroïdien sont assez bien connues chez les Mammifères (Pitt-Rivers et Cavalieri, 1964). La biogenèse hormonale est le résultat

d'une chaîne de réactions biochimiques qui comprend la concentration de l'iodure, son oxydation et sa substitution sur les restes de tyrosine d'une glycoprotéine spécifique, la thyroglobuline, et surtout la condensation de deux iodotyrosines en iodothyronines selon un processus encore hypothétique.

La thyroglobuline, principal constituant protéique de la thyroïde des Mammifères, renferme, sous forme d'iodotyrosines et d'iodothyronines, la majeure partie de l'iode de la glande. De nombreuses recherches ont porté sur la structure (Edelhoch et Rall, 1964 ; Edelhoch, 1965), sur la biosynthèse et l'iodation de cette protéine (Seed et Goldberg, 1963 ; Lissitzky *et al.*, 1964 ; Nunez *et al.*, 1965*a*), ainsi que sur la régulation de ces deux processus biochimiques par l'hormone thyréotrope (voir mises au point Nunez, 1968 ; Rappaport, 1970).

La structure de la thyroglobuline, dans laquelle 30 % de l'iode environ sont sous forme de thyroxine, joue vraisemblablement un rôle dans la biogenèse hormonale. Roche (1950), Roche et Michel (1955), Roche *et al.* (1963) ont suggéré que l'absence d'iodothyronine dans les scléroprotéines iodées des Invertébrés pouvait résulter de la structure fibreuse de ces protéines, qui est défavorable au rapprochement des résidus d'iodotyrosine, indispensable à la formation des hormones thyroïdiennes.

In vitro, l'iodation chimique (Roche, 1950) ou enzymatique (Taurog et Howells, 1966 ; Coval et Taurog, 1967 ; Perlman et Edelhoch, 1967 ; Taurog, 1970) de diverses protéines conduit à la formation de thyroxine. Mais pour obtenir une quantité importante d'iodothyronine, il semble que les protéines à ioder doivent présenter un poids moléculaire élevé, supérieur à 300 000 ; en outre, le rendement en thyroxine est plus élevé dans le cas de la thyroglobuline que dans celui des autres protéines (Taurog, 1970).

Chez les Vertébrés inférieurs, grâce à l'utilisation des isotopes radioactifs, le métabolisme de l'iode a été bien étudié (voir mises au point Berg *et al.*, 1959 ; Leloup et Fontaine, 1960 ; Dodd et Matty, 1964). Chez tous les Vertébrés, la biosynthèse hormonale semble procéder selon un schéma similaire, mais plus lentement chez les Vertébrés inférieurs et à des vitesses très variables selon l'espèce et la température à laquelle vit l'animal. Elle est en effet contrôlée, comme chez les Mammifères, par l'hormone thyréotrope (voir mise au point Gorbman, 1969), mais est aussi soumise à l'influence des variations du milieu environnant.

Ces données suggéraient implicitement la présence dans la thyroïde des Vertébrés inférieurs d'une protéine iodée similaire ou identique à la thyroglobuline des Mammifères, mais aucune étude n'avait porté sur les protéines thyroïdiennes des Vertébrés inférieurs au moment où ce travail a été entrepris.

En premier lieu, nous nous sommes proposée de caractériser les protéines thyroïdiennes chez diverses espèces de Vertébrés inférieurs, représentant un éventail zoologique assez large et dont la physiologie constitue depuis longtemps un sujet de recherches permanentes en laboratoire.

Puis, nous avons étudié, chez divers Poissons, la biosynthèse et les processus d'halogénation des protéines thyroïdiennes avant de pouvoir envisager le problème de leur régulation par l'hormone thyréotrope.

Au cours de ces recherches, nous avons été amenée à mettre en évidence l'existence de certaines différences spécifiques entre les protéines thyroïdiennes des divers Vertébrés considérés.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. Matériel

La liste taxinomique des espèces de Vertébrés inférieurs étudiés est donnée dans le tableau I.

L'expérimentation a porté principalement sur des Poissons présentant des conditions physio-écologiques bien différentes et variables au cours du cycle vital, qui ont fait antérieurement l'objet de nombreuses études en laboratoire.

Nous rappellerons les principales étapes du cycle migratoire du Saumon atlantique. Les jeunes Saumons, de parrs se transforment en parr-smolts puis en smolts et effectuent alors leur migration catadrome (vers la mer). Après leur période d'engraissement en mer, ils effectuent la migration anadrome de reproduction. Ils sont désignés sous les termes de Saumon de montée quand ils sont capturés au printemps dans les parties basses de l'Adour, puis de Saumons de frayères quand ils sont pêchés en hiver sur les lieux mêmes de reproduction. A la fin de la fraye, le Saumon succombe ou reprend une robe argentée ; dans ce dernier cas il est nommé Mended et entreprend sa seconde migration catadrome.

Tableau I. — Liste taxinomique et origine des animaux étudiés.

Classes	Noms taxinomiques	Noms communs	Origines géographiques
Cyclostomes	*Petromyzon marinus* L.	Lamproie marine	Loire, en migration anadrome reproductrice
Chondrichthyens	*Scyliorhinus canicula* L.	Petite Roussette	Manche et Méditerranée
Ostéichthyens			
s/classe : Dipneustes	*Protopterus annectens* Ow.	Protoptère	Tchad
s/classe : Actinoptérygiens			
Sup. O. Téléostéens			
O Clupéiformes	*Salmo salar* L.	Saumon atlantique	Adour, en migration anadrome, catadrome et phase reproductrice
	Salmo trutta L.	Truite de mer	Adour, en migration anadrome
	Salmo gairdnerii Rich	Truite de rivière	Pisciculture Gratereau
O. Anguilliformes	*Anguilla anguilla* L.	Anguille européenne	Somme
Reptiles			
Sup. O. Chéloniens	*Testudo radiata* Shaw	Tortue terrestre	Madagascar
Sup. O. Lépidosauriens			
s/O. Lacertiliens	*Uromastix acanthinurus* Bell	Fouette-queue	Algérie
s/O. Ophidiens	*Python sebae* (Gmelin)	Python	Congo
Sup. O. Archosauriens			
O. Crocodiliens	*Crocodilus niloticus* Laur.	Crocodile	Égypte

II. Processus expérimental

A. — Méthodes de marquage des protéines

1. Expériences effectuées in vivo

Les animaux sont sacrifiés à des temps variables après injection dans la cavité générale de ^{131}I ou ^{125}I (0,1 à 1 mC selon la taille des individus et l'isotope utilisé).

Après saignée des animaux, les thyroïdes ou nodules thyroïdiens sont rapidement prélevés et pesés. La thyroïde de la plupart des Téléostéens se disperse en nodules répartis autour de l'aorte ventrale et à proximité des bifurcations des artères branchiales. Les régions thyroïdiennes sont utilisées dans le cas de la Lamproie chez laquelle les follicules thyroïdiens sont disséminés dans les tissus adjacents, sans constituer de nodules.

2. Expériences effectuées in vitro

Les thyroïdes sont prélevées à 5°C, coupées, rincées dans le milieu d'incubation préalablement oxygéné, puis épongées sur du papier Joseph avant d'être pesées et réparties en lots homogènes d'environ 50 mg.

Chaque lot est incubé à l'aide d'un appareil Gilson ou Dubnoff, sous agitation continue, en atmosphère de carbogène (95 % O_2 ; 5 % CO_2) dans 1 ml de milieu en présence de 200 à 600 µC de tyrosine tritiée selon l'activité spécifique de cet acide aminé (0,4 à 32 C/mmole) ou de 100 à 200 µC de ^{125}I, à diverses températures et pendant des temps variables de 2, 6 ou 24 h.

La composition saline du sérum des Téléostéens étant très similaire à celle du sérum des Mammifères (Field *et al.*, 1943 ; Phillips *et al.*, 1957), les solutions salines de type mammalien conviennent très bien à la culture des cellules de Poissons (Wolf, 1963). Au contraire, les milieux hypotoniques utilisés pour les cellules des Amphibiens sont déconseillés.

Le milieu de Campagne et Grüber (1962) a été utilisé pour incuber les thyroïdes des Mammifères (Nunez *et al.*, 1964).

A titre de comparaison, nous avons incubé des nodules thyroïdiens de Saumon dans le milieu mammalien et dans la solution de Cortland employée pour les cellules des Salmonidés (Phillips *et al.*, 1957), supplémentée en acides aminés et fumarate dans des proportions identiques au milieu précédent. Les résultats obtenus dans ces deux milieux sont similaires.

Le milieu de Campagne et Grüber a ensuite été choisi, puisque les solutions de type mammalien conviennent aussi à la survie des cellules de Reptiles (Stephenson, 1966). Il est additionné d'urée et de NaCl dans le cas de thyroïde de Chondrichthyens (Lockwood, 1961). Comme nous le verrons dans la seconde partie, la structure folliculaire des thyroïdes de Poissons est bien conservée après 24 h d'incubation à 20°C dans le milieu de Campagne et Grüber (fig. 9-10).

Dans certains cas, des antithyroïdiens, perchlorate de sodium et propylthiouracile, sont ajoutés dans le milieu d'incubation, aux concentrations respectives de 2 et 1 mM.

B. — Préparation des protéines solubles

Les diverses manipulations sont effectuées à basse température (5°C).

1. Expériences effectuées in vivo

Les thyroïdes sont broyées à l'aide d'un homogénéiseur de Potter dans un faible volume d'un tampon phosphate standard (pH 7,4 ; 0,02M Na_2HPO_4 ; 0,1M NaCl ; μ 0,15) la concentration finale étant de 5 à 10 % (poids de tissu frais/volume).

Les régions thyroïdiennes sont broyées dans un plus grand volume de tampon ; 90 % de la radioactivité sont alors extraits.

L'homogénat thyroïdien est centrifugé à 100 000 g pendant 1 h (rotor 40/2) afin d'éliminer les particules. Le surnageant est ensuite analysé.

2. Expériences effectuées in vitro

A la fin de l'incubation, le tissu thyroïdien est homogénéisé dans le milieu d'incubation. Une partie aliquote de l'homogénat thyroïdien est chromatographiée sur papier en butanol - acide acétique - eau (78-5-17 v/v) afin de déterminer les pourcentages d'incorporation des traceurs dans les glandes.

L'excès de ^{3}H-Tyr ou de ^{125}I est éliminé par dialyse prolongée (24 h) contre 2 à 3 × 1 litre de tampon phosphate (pH 7,4 ; μ 0,15). La chromatographie d'une partie aliquote de l'homogénat thyroïdien dialysé permet de vérifier l'élimination des marqueurs.

Le dialysat est ensuite centrifugé à 100 000 g pendant 1 h. Les protéines solubles marquées du surnageant sont analysées. Les protéines particulaires contenues dans le culot ne sont pas étudiées.

III. Méthodes analytiques

1. Ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose

Les extraits thyroïdiens solubles sont analysés selon la technique de Martin et Ames (1961).

Les solutions de saccharose sont préparées dans le tampon phosphate précité (pH 7,4 ; $\mu = 0{,}15$).

Les caractéristiques des gradients linéaires de saccharose et les conditions d'ultracentrifugation (ultracentrifugeuses Spinco L 50 et L_2 65 B) sont données dans le tableau II pour chaque type de rotor utilisé. Les rotors SW 39, SW 50, SW 65 et SW 41 ont été successivement employés. Les meilleurs pouvoirs de résolution des centrifugations sont obtenus avec les deux derniers types de rotor. La température de centrifugation est de 5°C en général.

A la fin de la centrifugation, les gradients de densité sont fractionnés selon la technique décrite par Martin et Ames (1961). Les fractions sont recueillies dans des tubes ou sur des rectangles de papier Whatman n° 3 (3 × 6 cm) si les protéines sont marquées par le tritium. Les mesures de radioactivité et/ou les dosages de protéines (Lowry *et al.*, 1951) sont effectués dans chaque fraction.

Tableau II. — Caractéristiques des gradients linéaires de saccharose. Conditions d'ultra-centrifugation dans les différents types de rotors utilisés (ultracentrifugeuses Spinco L50 et L_2 65 B).

Rotors	Concentrations extrêmes en saccharose	Volume total des gradients (ml)	Extrait déposé sur le gradient (ml)	Vitesses (tpm)	Durée (h)	Volume des fractions (ml)
SW 39	5-20 %	4,6	0,1	38 000	5 h 30	0,09 à 0,13
SW 50	5-20 %	4,6	0,1	48 000	3 h 45	0,09 à 0,13
SW 65	5-20 %	4,6	0,1	65 000	2 h 15	0,09 à 0,13
SW 41	7-24 %	11,0	0,1-0,2	41 000	7 à 8	0,23

Détermination des coefficients de sédimentation

La technique de MARTIN et AMES permet d'évaluer indirectement le coefficient de sédimentation d'une protéine à partir de celui d'une protéine référence dont le coefficient de sédimentation est connu.

Toutefois, pour déterminer plus précisément ce paramètre, il est nécessaire d'utiliser la technique du « standard interne » (LACHIVER *et al.*, 1966). Un mélange de la protéine référence (20 µl) et de l'extrait thyroïdien à analyser (80 µl) est délicatement déposé sur le gradient linéaire de saccharose, puis centrifugé. Ainsi, les protéines référence et à étudier sont centrifugées dans des conditions rigoureusement identiques.

La protéine référence est marquée par l'un des isotopes de l'iode ^{131}I ou ^{125}I. Les protéines référence et à analyser sont identifiées par les mesures des isotopes radioactifs qui les marquent respectivement. La protéine à analyser peut être également identifiée par le dosage desp rotéines selon LOWRY *et al.* (1951).

Références

Lors de nos premières expériences, la thyroglobuline de Rat marquée in vivo par ^{131}I ou ^{125}I a été utilisée comme référence (LACHIVER *et al.*, 1965). Mais ultérieurement, après avoir constaté que le coefficient de la thyroglobuline de Rat varie sensiblement avec son taux d'iodation et la teneur en iode du régime alimentaire (LACHIVER *et al.*, 1966), nous avons adopté comme terme de référence la valeur 19 S pour la thyroglobuline de Mouton et de Bœuf (EDELHOCH et BALL, 1964).

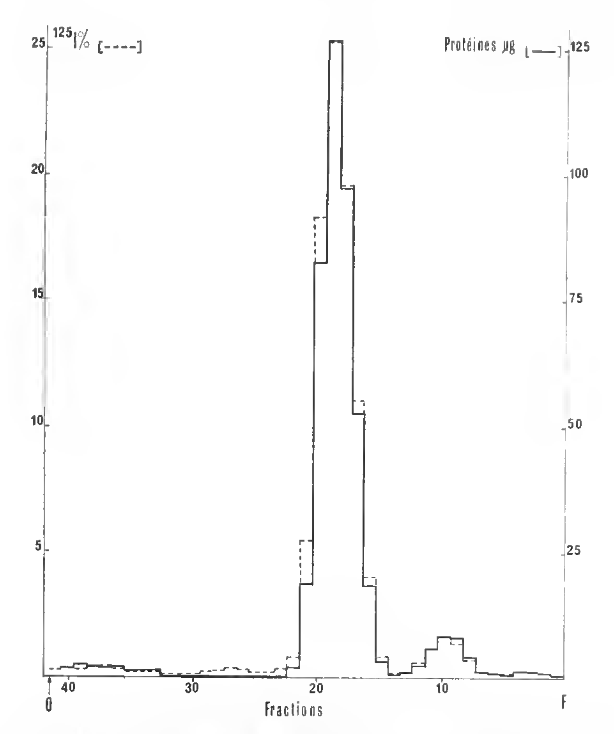


FIG. 1. — *Ultracentrifugation en gradient de saccharose de la thyroglobuline purifiée de Bœuf marquée in vitro par ^{125}I.*

500 mg de thyroïde de Bœuf sont incubés en présence de 500 µC de ^{125}I. Ultracentrifugation à 65 000 tpm. *Ordonnées :* ^{125}I exprimé en pour cent de la radioactivité totale déposée sur le gradient. Protéines µg, dosées selon LOWRY *et al.* (1951). *Abscisses :* Nombre de fractions recueillies.

O : sommet du gradient ; F : fond.

Ces préparations de thyroglobuline sont réalisées en incubant des coupes de thyroïde de Mouton ou de Bœuf dans un milieu de Campagne et Grüber (1962) en présence de ^{131}I ou ^{125}I. Les homogénats thyroïdiens sont ensuite purifiés par relargage au sulfate d'ammonium entre 1,4 et 2 M, à 5°C (fig. 1). Dans ces préparations, le pic de radioactivité et celui de densité optique déterminé selon Lowry *et al.*, coïncident exactement (fig. 1). La protéine référence ainsi purifiée doit présenter une radioactivité spécifique élevée (5 à 10 000 cpm/µg protéine) de façon à ce que la quantité de protéine ajoutée comme standard interne soit négligeable comparativement à la quantité de matériel protéique analysé.

Calcul du coefficient de sédimentation

Dans les gradients linéaires de saccharose, il existe une relation linéaire entre le coefficient de sédimentation et la distance parcourue par les macromolécules.

Si S_1 et S_2 sont les coefficients de sédimentation de la protéine référence et de la protéine à analyser et x_1 et x_2 les distances parcourues respectivement par ces deux protéines, nous avons :

$$S_2 = S_1 \times \frac{x_2}{x_1}$$

En pratique, nous comptons le nombre de fractions comprises entre l'origine de la migration des molécules (O) et les sommets respectifs des pics de la protéine standard (n_1) et de la protéine à étudier (n_2). Nous avons :

$$S_2 = S_1 \times \frac{n_2}{n_1}$$

Lorsque les pics protéiques sont légèrement asymétriques, les sommets de ces pics sont déterminés par l'intersection des droites joignant les différents points des branches ascendante et descendante de chaque pic.

Quelle que soit la thyroglobuline référence utilisée (Bœuf ou Rat), la valeur de S obtenue pour la thyroglobuline d'un extrait thyroïdien donné est la même.

En accord avec Inoue et Taurog (1968), la reproductibilité des valeurs de S obtenues est de $\pm$ 0,1 S.

Pour des protéines de volume spécifique partiel et de forme identique, Svedberg et Pedersen (1940) ont mis en évidence l'existence d'une relation entre les coefficients de sédimentation et les masses moléculaires de ces protéines, telle que :

$$S_1/S_2 = (M_1/M_2)^{2/3}$$

où S_1 et M_1 sont respectivement le coefficient de sédimentation et la masse moléculaire d'une protéine référence et S_2 et M_2, ces mêmes paramètres pour une protéine inconnue.

La détermination du coefficient de sédimentation S_2 de cette dernière permet donc de calculer son poids moléculaire approximatif.

2. **Radioisotopes utilisés. Méthodes de comptage**

a — *Iode radioactif :* ^{131}I et ^{125}I

Deux isotopes radioactifs de l'iode sont utilisés : ^{131}I : période de 8 jours, rayonnement γ de 360 Kev : ^{125}I : période de 57 jours, rayonnement x de 29 et 32 Kev.

Les mesures de radioactivité sont effectuées dans un compteur à scintillation (cristal puits INa activé au thallium) muni d'un spectromètre à deux échelles de comptage (Nuclear Chicago-Ultrascaler II). Les valeurs obtenues pour ^{125}I sont corrigées de la faible interférence (7 %) du spectre de ^{131}I dans celui de ^{125}I.

b — *Tyrosine tritiée* : 3-5 $^{3}H_2$-tyrosine

La tyrosine marquée par le tritium est synthétisée par M. Pommier (CHU Kremlin-Bicêtre) selon la technique de Nunez *et al.* (1962).

Les comptages de tritium sont réalisés à l'aide d'un compteur à scintillation liquide à trois canaux (Nuclear Chicago n° 725 ou Intertechnique SL 40).

Pour des mesures d'activité relative, les échantillons sont déposés sur des rectangles de papier Whatman 3 MM imbibé de mélange scintillant (Nunez et Jacquemin, 1961). Le rendement du comptage atteint respectivement 10 et 20 % avec ces compteurs.

Pour les mesures d'activité absolue, les échantillons sont précipités par l'acide trichloracétique (Allen et Schweet, 1962), puis dissous dans 1 ml de « Soluène » (Packard). Après hydrolyse à 50°C, on ajoute 50 µl de CH_3 COOH, puis 15 ml de mélange scintillant (PPO + POPOP). La correction d'absorption est effectuée par la méthode du standard externe. Les résultats sont exprimés en désintégrations par minute.

c — *Iode radioactif (^{125}I) et tritium (^{3}H)*

Lorsque ces isotopes sont contenus dans un mélange, leurs spectres d'énergie ne pouvant être séparés, l'iode est d'abord mesuré seul dans le compteur γ. Puis les comptages en scintillation liquide, qui correspondent au rayonnement ^{3}H et à l'interférence de ^{125}I (80 %) sont effectués. Afin de diminuer la valeur de la correction, des activités en ^{3}H très supérieures à celles du ^{125}I sont déposées sur le gradient.

3. Dosages de l'iode ^{127}I et des protéines

Après ultracentrifugation en gradient de saccharose des extraits thyroïdiens, les dosages de ^{127}I et des protéines sont réalisés à l'aide de l'autoanalyseur Technicon, dans chaque fraction recueillie.

a — *Iode ^{127}I*

L'iode stable est dosé, selon la méthode classique au sulfate cérique après minéralisation en milieu acide des substances organiques (Foissac, 1964).

La sensibilité des mesures permet de doser 0,5 à 1 µg de ^{127}I %.

b — *Protéines*

Le dosage des protéines, selon la technique de Folin-Lowry (Lowry *et al.*, 1951) a été adapté à l'emploi de l'autoanalyseur (Lachiver, *sous presse*). L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une thyroglobuline de Bœuf purifiée par relargage au sulfate d'ammonium et filtration sur Sépharose 6 B.

La limite de sensibilité du dosage est de 0,5 à 1 µg de protéine par ml.

Les récupérations sur la totalité des gradients sont de l'ordre de 90 à 95 %, tant pour les protéines que pour l'iode ^{127}I.

Ces dosages permettent de déterminer les taux d'iodation des protéines au niveau de chaque fraction du gradient.

Auparavant, il a été vérifié que le rapport $\frac{^{127}I}{\text{protéines}}$ est sensiblement constant pour une gamme étendue de concentration en thyroglobuline de Bœuf allant de 5 à 100 µg de protéines/ml. Par ailleurs, les courbes d'étalonnage des thyroglobulines des diverses espèces de Poissons étudiées et celles de Bœuf sont superposables.

4. Détermination de la composition en acides aminés des thyroglobulines

Les thyroglobulines de diverses espèces de Poissons sont préalablement purifiées avant de déterminer leurs compositions en acides aminés.

Les hydrolyses de quelques centaines de µg (250 à 1 000 µg) de ces thyroglobulines, par HCl 6N, en tube scellé sous atmosphère d'azote, sont conduites pendant 22 h et 48 h à 110°C.

Des essais préliminaires effectués sur la thyroglobuline de Bœuf nous avaient permis de constater qu'après 72 h d'hydrolyse les pourcentages de la plupart des acides aminés étaient inférieurs à ceux obtenus après 22 et 48 h d'hydrolyse.

La composition en acides aminés des hydrolysats est déterminée selon Moore *et al.* (1958) à l'aide de l'autoanalyseur Beckman (modèle 120 B). La cystine et la valine sont totalement séparées. Pour chaque préparation de thyroglobuline purifiée, les analyses sont réalisées au minimum en double pour chaque temps d'hydrolyse.

La précision du dosage, évaluée sur un grand nombre de mesures réalisées sur mélange étalon, est de $\pm$ 2 %.

IV. Méthodes préparatives : purification des thyroglobulines

La rareté du matériel à analyser nous a conduite à choisir des méthodes de purification efficaces et présentant un rendement assez élevé.

A. — Ultracentrifugation préparative en gradient de saccharose 5-20 %

Réalisée avec le rotor SW 25-1 pendant 23 h à 25 000 tpm (Salvatore *et al.*, 1964), elle est utilisée pour purifier de petites quantités de protéine. Sur chacun des trois tubes de centrifugation, 1 ml d'extrait thyroïdien, marqué par l'iode radioactif, contenant environ 10 mg de protéines, est déposé. La thyroglobuline est identifiée après mesure de la radioactivité dans chaque fraction des gradients. Le rendement de cette technique atteint 70 % environ.

B. — Filtration sur gel Sépharose 6B

Elle permet de purifier 100 à 200 mg de protéines en une seule opération. Le gel, mis en suspension dans l'eau distillée, est versé dans des colonnes dont les dimensions sont choisies en fonction de la quantité de matériel à purifier (tabl. III). Abondamment lavé à l'eau distillée, le gel est ensuite équilibré avec le tampon phosphate (pH 7,4 ; μ = 0,15) à 5°C sous légère pression.

Tableau III. — Purification des thyroglobulines par filtration sur gel Sépharose 6 B.

Quantité de protéines a purifier (mg)	Dimensions des colonnes (cm)	Extrait thyroïdien déposé (ml)	Débit (ml/h)	Volume des fractions (ml)
100 — 200	120 × 2	5 à 10	7	5
100	78 × 1	1,5	1,6	1,3

Après dépôt de l'extrait sur les colonnes, l'élution est réalisée dans le même tampon. Les fractions sont recueillies automatiquement à l'aide d'un collecteur de fraction Beckman LKB. Les mesures de densité optique à 280 mμ sont effectuées pour chaque fraction. Cette technique permet de séparer partiellement la thyroglobuline de ses polymères. Le rendement atteint 60 à 70 %.

Dans le cas de ces deux techniques, les fractions correspondant à la thyroglobuline sont réunies puis relarguées par du sulfate d'ammonium.

L'analyse des préparations de thyroglobuline obtenues est ensuite réalisée (cf. 4e partie).

V. Traitements divers

1. Traitement des extraits thyroïdiens par le dodécyl sulfate de sodium

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) est ajouté aux extraits thyroïdiens solubles, afin d'obtenir une concentration finale de $1,5 \times 10^{-3}$M de SDS. Le mélange est laissé 1 h à 20°C. Le rapport :

$$\frac{\mu g \text{ de SDS}}{\mu g \text{ de protéines totales de l'extrait}}$$

est compris entre 0,1 et 0,3. Dans cet intervalle, la dissociation de la thyroglobuline par le SDS est quasi maximale.

2. Précipitation des protéines par l'acide trichloracétique

La méthode utilisée est celle d'Allen et Schweet (1962). Après incubation des thyroïdes, des aliquotes de l'homogénat thyroïdien total sont précipitées par l'acide trichloracétique en présence de 7 mg de caséine entraîneur. Le culot est lavé deux fois par l'acide trichloracétique, dissous dans la soude (N), puis précipité à nouveau par l'acide trichloracétique. Le précipité est ensuite lavé par l'acide trichloracétique, puis par l'alcool, avant d'être dissous dans le « Soluène ».

VI. Produits utilisés

Les produits chimiques courants proviennent de Prolabo, et Touzart et Matignon. Ils sont tous de pureté maximale (« Pour analyse »). Les acides aminés ont été fournis par Calbiochem et Prolabo. La provenance des autres substances utilisées est la suivante : Saccharose : Analar ; Sépharose 6 B : Pharmacia ; Pénicilline et Streptomycine (sulfate) : Laboratoire Spécia ; Soluène : Packard C° : POPOP (50 mg/l) PPO (4 g/l) : Nuclear Chicago.

^{125}I et ^{131}I sans entraîneur et sans réducteur ont été fournis par le Commissariat à l'Énergie atomique.

^{3}H-Tyr a été gracieusement fournie par le Dr Nunez, directeur de l'Unité de Recherche INSERM sur la glande thyroïde et la Régulation Hormonale (CHU Bicêtre).

VII. Abréviations

TG_2 ou TG	: thyroglobuline.
TG_1, TG_4, TG_6	: iodoprotéines thyroïdiennes apparentées à la thyroglobuline TG_2.
préTG	: préthyroglobuline.
MIT	: monoiodotyrosine.
DIT	: diiodotyrosine.
TSH	: hormone thyréotrope.
PTU	: propylthiouracile.
$NaClO_4$	: perchlorate de sodium.
SDS	: dodécyl sulfate de sodium.
DPM	: désintégrations par minute.
^{3}H-Tyr	: tyrosine tritiée en position 3 et 5.
RAS	: radioactivité spécifique.
D.O.	: densité optique.

I. MISE EN ÉVIDENCE DES IODOPROTÉINES SOLUBLES THYROÏDIENNES CHEZ DIVERSES ESPÈCES DE VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

La thyroglobuline de poids moléculaire 670 000 et de coefficient de sédimentation 19 S constitue la principale protéine de la thyroïde des Mammifères et renferme 80 % de l'iode total de la glande (Robbins et Rall, 1960 ; Edelhoch et Rall, 1964).

Shulman *et al.* (1955), Edelhoch (1960), Ui et Tarutani (1961) ont montré que les extraits thyroïdiens mammaliens, après ultracentrifugation analytique, contiennent plusieurs constituants protéiques en dehors de la thyroglobuline. En effet, les protéines iodées purifiées par fractionnement par les sels neutres selon Derrien *et al.* (1948) se révèlent hétérogènes en chromatographie sur colonne de diéthylaminoéthyl cellulose (Ingbar *et al.*, 1959 ; Roche *et al.*, 1960 ; Spiro, 1961 ; Ui *et al.*, 1961), en électrophorèse sur gel d'amidon (Spiro, 1961) et en électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Torresani *et al.*, 1968*a*).

Des iodoprotéines thyroïdiennes de poids moléculaire différent de celui de la thyroglobuline sont séparables par ultracentrifugation en gradient de saccharose (Fontaine et Lachiver, 1964 ; Salvatore *et al.*, 1964).

Une iodoprotéine 27 S de poids moléculaire double de celui de la TG a été isolée à partir des glandes de divers Mammifères et caractérisée par Salvatore *et al.* (1965*a*). La similitude de la composition en acides aminés et des propriétés immunochimiques de la thyroglobuline 19 S et de la 27 S (Carlomagno *et al.*, 1970), ainsi que les expériences de dissociation de la 27 S (Vecchio *et al.*, 1966*a*) suggèrent que cette iodoprotéine est un dimère de la thyroglobuline 19 S.

La présence d'une protéine de vitesse de sédimentation plus élevée $\simeq$ 32 S a parfois été observée (Salvatore *et al.*, 1964 ; Lachiver *et al.*, 1965).

Une iodoprotéine 12 S, de poids moléculaire moitié moindre de celui de la 19 S, a été mise en évidence, en proportion variable, dans les extraits thyroïdiens de diverses espèces de Mammifères, en particulier chez le Lérot (Lachiver et Fontaine, 1964) et chez le Cobaye (Lachiver *et al.*, 1965 ; Salvatore *et al.*, 1965*c*). L'origine de cette protéine est très controversée car celle-ci peut correspondre à un précurseur ou à un produit de dissociation de la thyroglobuline 19 S.

Ces diverses iodoprotéines thyroïdiennes, bien que de poids moléculaire différent, présentent en commun un certain nombre de propriétés physico-chimiques qui permet de les distinguer des autres protéines présentes dans les extraits thyroïdiens et susceptibles de s'ioder, comme l'albumine (Torresani *et al.*, 1968*b* ; Jonckheer et Karcher, 1971), ou non, comme l'hémoglobine :

— les iodoprotéines thyroglobuliniques précipitent dans une zone étroite de concentration en divers sels neutres (36 à 41 % de la saturation en sulfate d'ammonium pH 6,9 ; 43 à 48 % du mélange équimoléculaire des phosphates mono- et dipotassique 3,5 M à 20°C (Derrien *et al.*, 1948) ;

— elles sont éluées en front de colonne après filtration sur gel Sephadex G 200 ou sur gel d'Agar (Salvatore *et al.*, 1964) ;

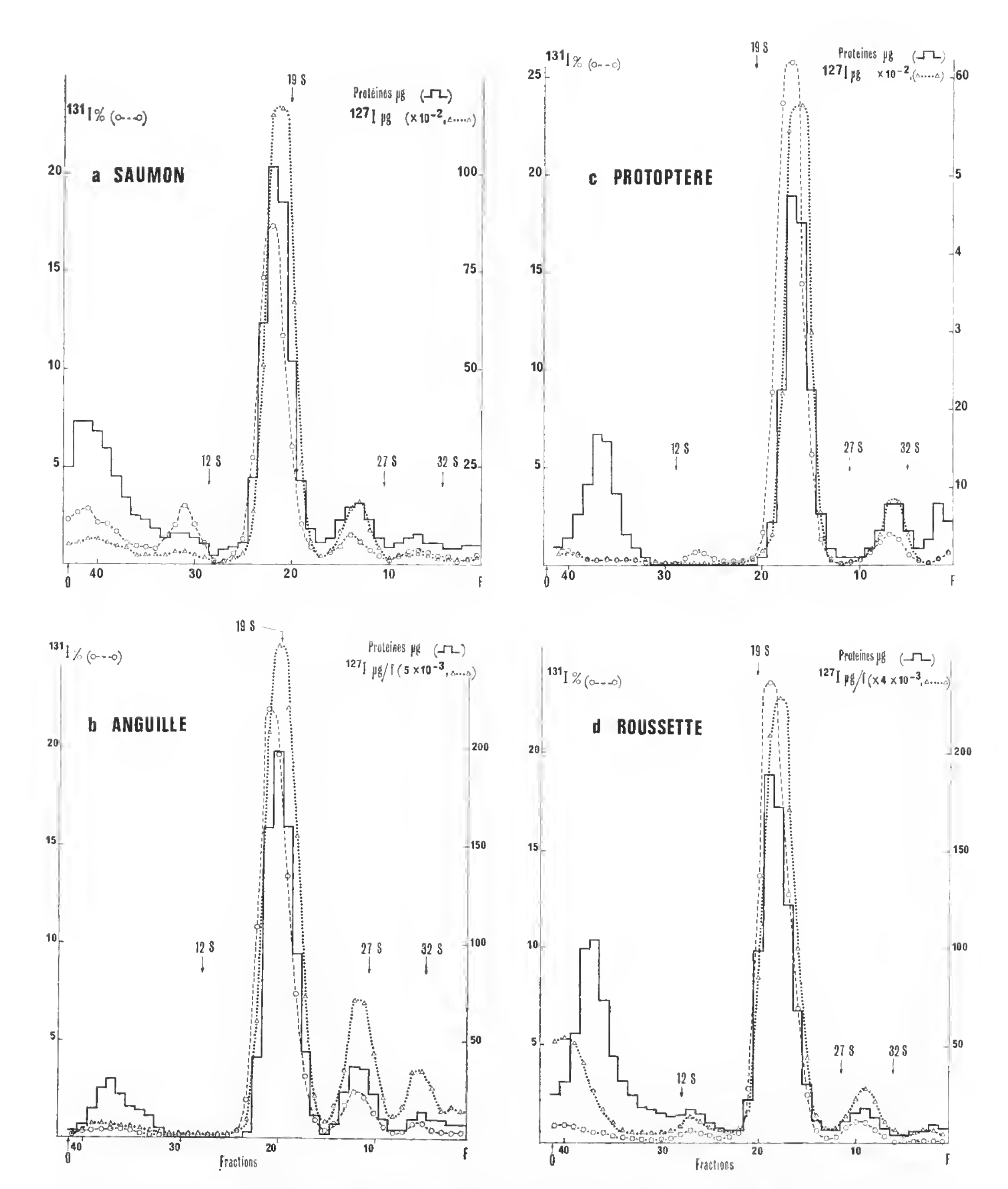


FIG. 2. — *Ultracentrifugation en gradient de saccharose des protéines solubles marquées in vivo dans la thyroïde de divers Poissons.*

Après dialyse contre tampon phosphate (pH 7,4 ; µ : 0,15), 100 µl de l'extrait thyroïdien marqué par ^{131}I et 20 µl d'une solution de ^{125}I TG de Bœuf (19 S) sont centrifugés à 5°C, pendant 7 h à 41 000 tpm. Radioactivité en ^{131}I : exprimée en pour cent de la radioactivité déposée sur le gradient.

Abscisses : nombre de fractions recueillies (20 gouttes).

O : sommet du gradient ; F : fond.

Pour chaque espèce, la position de la thyroglobuline de Bœuf 19 S dans le gradient est indiquée par une flèche, ainsi que celles des coefficients de sédimentation 12, 27, 32 S.

— elles présentent une même composition en acides aminés et contiennent en particulier des acides aminés iodés : mono- et diiodotyrosines, et de la thyroxine T_4.

L'utilisation de divers critères d'identification nous a permis de mettre en évidence, dans les extraits thyroïdiens de plusieurs Vertébrés inférieurs appartenant à des classes différentes, la présence d'iodoprotéines thyroglobuliniques analogues à celles existant dans la thyroïde des Mammifères.

Nous avons étudié la répartition de ces iodoprotéines thyroïdiennes et déterminé le taux d'iodation de la thyroglobuline chez diverses espèces.

A. — Caractérisation des iodoprotéines thyroïdiennes solubles et nomenclature

1. Ultracentrifugation en gradient de saccharose

Après injection d'iode radioactif quelques heures ou plusieurs jours avant le sacrifice des animaux, les protéines thyroïdiennes solubles sont analysées par ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose. La radioactivité, les teneurs en protéines et en ^{127}I sont déterminées dans chaque fraction du gradient. Les coefficients de sédimentation des diverses protéines séparées sont calculés par rapport à celui d'une thyroglobuline de Bœuf 19 S purifiée, marquée par ^{125}I ou ^{131}I selon l'isotope injecté aux animaux et ajoutée à l'état de trace à l'extrait analysé.

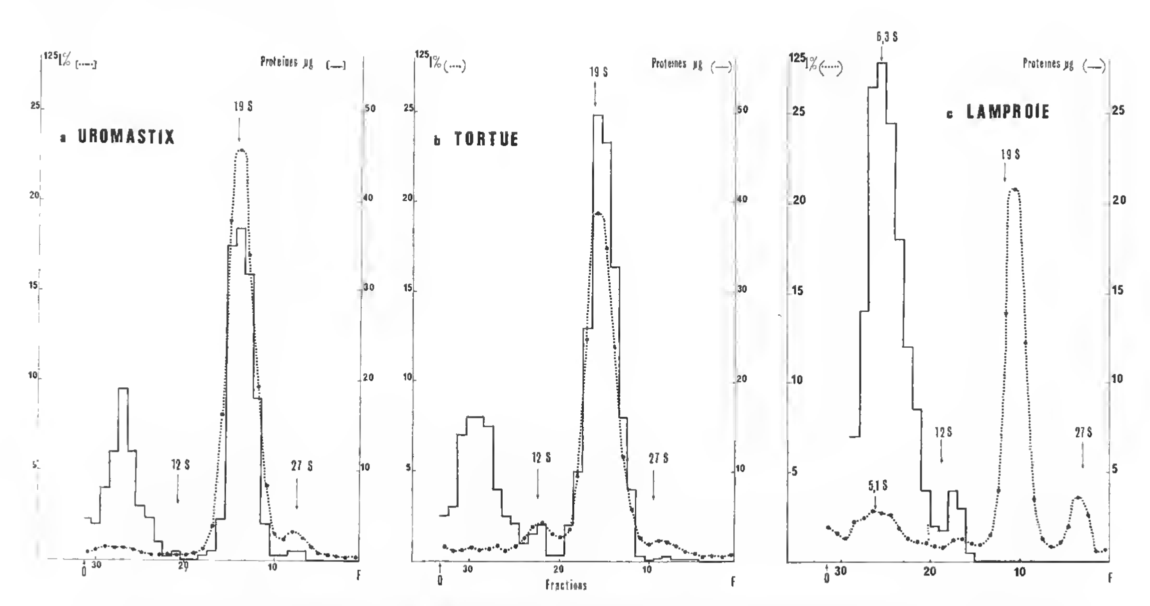


Fig. 3. — *Ultracentrifugation en gradient de saccharose des protéines solubles marquées in vivo dans la thyroïde de deux Reptiles et d'un Cyclostome.*

L'Uromastix, la Tortue et la Lamproie sont sacrifiés respectivement 4 h, 24 h et 8 jours après l'injection de ^{125}I. 80 µl de chaque extrait thyroïdien soluble et 20 µl d'une solution de ^{131}I TG de Bœuf (19 S) sont centrifugés pendant 3 h 30 à 48 000 tpm. Fractionnement du gradient en 10 gouttes.

Les profils des gradients obtenus pour diverses espèces de Poissons, deux Reptiles et la Lamproie sont représentés sur les figures 2 et 3.

L'ultracentrifugation sépare par ordre croissant de coefficient de sédimentation :

a — Une zone située en front de gradient correspondant aux protéines (3-8 S) de faible poids moléculaire. Cette zone contient les protéines non thyroglobuliniques (albumine, hémoglobine) qui sont en partie d'origine plasmatique et ne sont pas ou très peu iodées. Chez la Roussette (fig. 2 d), une fraction de ^{127}I se situe à l'origine du gradient sans correspondre au pic de protéines ; chez la Lamproie un pic radioactif $\simeq$ 5 S est mis en évidence même huit jours après l'injection d'iode radioactif (fig. 3 c).

b — Une fraction protéique dont le coefficient de sédimentation est voisin de 12 S. Elle n'existe pas dans tous les extraits thyroïdiens.

c — Une protéine iodée dont le coefficient de sédimentation voisin de 19 S permet de l'identifier provisoirement à la thyroglobuline. Chez la Lamproie, cette protéine n'est décelable qu'après marquage par l'iode radioactif (fig. 3 c).

d — Enfin deux iodoprotéines de vitesse de sédimentation respectivement voisines de 27 et 32 S. Le composé 32 S n'est pas toujours mis en évidence.

La radioactivité liée à ces diverses fractions protéiques 12, 19, 27 et 32 S est précipitable à 95 % par l'acide trichloracétique.

Les extraits thyroïdiens des diverses espèces de Vertébrés inférieurs étudiés contiennent donc des iodoprotéines solubles fixant in vivo l'iode radioactif, dont les coefficients de sédimentation sont voisins de ceux des protéines thyroïdiennes des Mammifères, mais qui varient très sensiblement selon l'espèce considérée (fig. 2 et 3) (Lachiver et Martin, 1966).

Les variations spécifiques des coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes seront discutées ultérieurement.

2. Filtration sur gel Sépharose 6 B

La filtration sur gel Sépharose 6 B des extraits thyroïdiens de diverses espèces de Poissons et de Reptiles montre qu'ils contiennent principalement une protéine dont le volume d'élution est proche de celui de la thyroglobuline 19 S de Bœuf.

La figure 4 donne un exemple des profils d'élution d'un extrait thyroïdien brut de Truite et d'un extrait thyroïdien de Bœuf purifié par relargage au sulfate d'ammonium entre 1,4 et 2,2 M à 5°C.

L'épaulement de la courbe d'absorption à 280 mμ au niveau des premières fractions éluées après le volume mort de la colonne, correspond aux protéines les plus lourdes de l'extrait thyroïdien.

La fraction protéique de faible importance qui est éluée le plus tardivement et présente un spectre d'absorption à 414 mμ est identifiable à l'hémoglobine contenue dans cet extrait.

Les fractions de la partie apicale du principal pic protéique sont réunies puis concentrées par dialyse sous vide. Ce matériel protéique, analysé par ultracentrifugation en gradient de densité présente un coefficient de sédimentation égal à celui du constituant protéique majeur présent dans l'extrait thyroïdien salin, dans le cas de chacune des espèces étudiées.

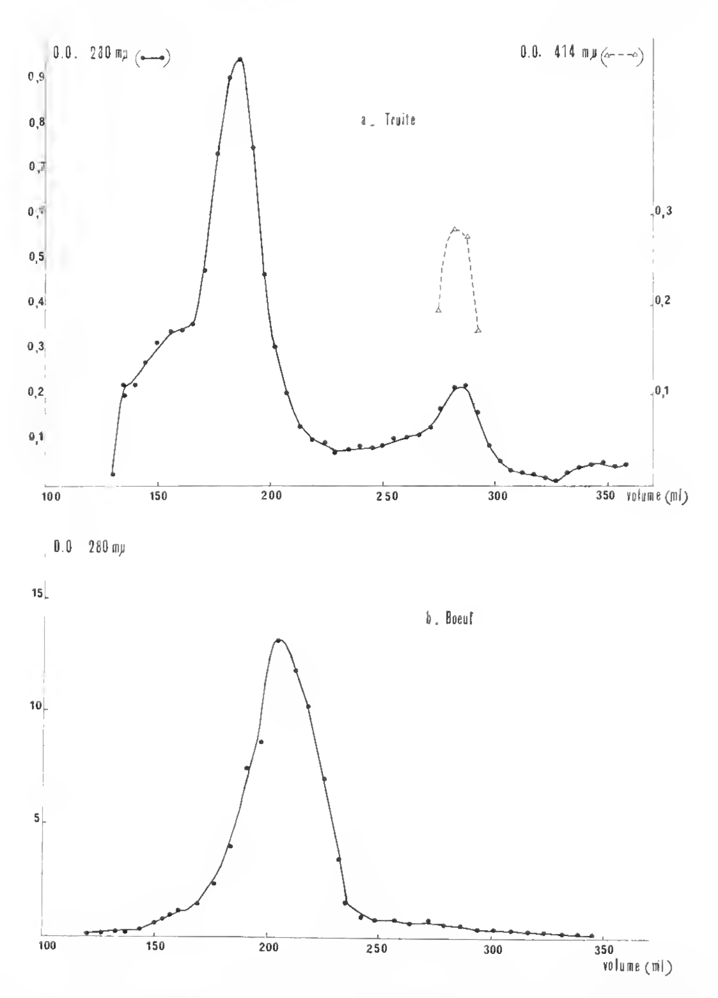


Fig. 4. — *Filtration sur gel Sépharose 6 B d'un extrait thyroïdien brut de Truite (a) et d'un extrait thyroïdien de Bœuf (b) purifié par relargage au sulfate d'ammonium entre 1,4 et 2,2 M à 5°C.*

3. Autres critères d'identification de la thyroglobuline

La protéine iodée de coefficient de sédimentation voisin de 19 S a été isolée par filtration sur gel Sépharose 6 B ou par centrifugation préparative (rotor SW 25-1), puis purifiée par relargage au sulfate d'ammonium pH 6,9 entre des solutions 1,4 et 2,2 M ou 1,4 et 2,7 M selon l'espèce considérée.

Dans les divers cas étudiés, l'hydrolyse par HCl 6N de cette protéine montre que sa composition en acides aminés, déterminée selon Moore *et al.* (1958), est qualitativement similaire de celle de la thyroglobuline mammalienne (cf. 4e partie).

Enfin l'hydrolyse de cette protéine par la pronase et la leucylaminopeptidase libère

des acides aminés iodés, mono- et diiodotyrosines et de la thyroxine qui sont identifiés après chromatographie sur papier en butanol acétique et ammoniacal, par mesure de l'iode radioactif ou de l'iode 127.

Les divers critères d'identification utilisés montrent que la thyroïde des Vertébrés inférieurs étudiés contient principalement une iodoprotéine analogue à la thyroglobuline des Mammifères.

L'analogie du profil d'ultracentrifugation des diverses fractions protéiques iodées thyroïdiennes chez les Vertébrés inférieurs, avec celui des iodoprotéines existant dans la thyroïde des Mammifères, permet de penser qu'elles correspondent par ordre croissant de coefficient de sédimentation à la sous-unité de la thyroglobuline, à la thyroglobuline et aux polymères de cette protéine.

Dans la littérature, les iodoprotéines thyroïdiennes des Mammifères sont généralement désignées par la valeur de leur constante de sédimentation : 12, 19, 27, 32 S. Mais l'existence de variations du coefficient de sédimentation de chacune d'entre elles chez les Poissons rend une telle notation inexacte et ambiguë dans certains cas (fig. 2 et 3). Aussi nous utiliserons la nomenclature proposée par LISSITZKY *et al.* (1966) (tabl. IV).

TABLEAU IV. — Nomenclature des iodoprotéines thyroïdiennes apparentées à la thyroglobuline chez les Vertébrés inférieurs.

SIGLES UTILISÉS	COEFFICIENTS DE SÉDIMENTATION APPROXIMATIFS	IODOPROTÉINES THYROGLOBULINIQUES
TG_1	12 S	sous-unité de TG_2
TG_2	19 S	thyroglobuline sensu stricto
TG_4	27 S	polymère de TG_2
TG_6	32 S	polymère de TG_2

B. — PROPORTIONS RELATIVES DES IODOPROTÉINES THYROÏDIENNES SOLUBLES. TAUX D'IODATION MOYEN DE CES PROTÉINES

1. Proportions relatives des iodoprotéines

L'ensemble des protéines thyroïdiennes TG_1, TG_2, TG_4 et TG_6 représentent de 55 à 80 % des protéines totales solubles contenues dans les extraits. Environ 90 % de l'iode ^{127}I total sont liés à ces protéines.

Les proportions relatives de chacune de ces iodoprotéines et la distribution de ^{127}I entre elles sont calculées en pour cent de la somme de ces protéines et de l'iode ^{127}I qui leur est lié. La fraction 3-8 S contenant essentiellement les protéines non apparentées à la thyroglobuline n'est pas prise en considération (tabl. V).

— Chez les diverses espèces étudiées, à l'exception de la Lamproie, la thyroglobuline TG_2 est le principal constituant protéique et contient la majeure partie de l'iode ^{127}I. Par contre, la TG_2 native n'existe qu'à l'état de traces chez le Cyclostome (fig. 3 e).

— Le pourcentage de TG_1 est très variable selon l'espèce. Elle constitue la principale iodoprotéine dans le cas de la Lamproie et existe en proportion relativement importante chez le Saumon, la Roussette et la Tortue. Mais elle n'est pas identifiée chez l'Uromastix et est rarement décelable chez l'Anguille.

— Les polymères TG_4 et TG_6 représentent chez les Poissons étudiés un pourcentage élevé qui atteint le plus souvent 20 % et même 33 % chez la Truite de mer. Des proportions équivalentes en ^{127}I correspondent à ces protéines. Les proportions de ces polymères sont beaucoup plus faibles chez deux Reptiles : Uromastix et Tortue.

TABLEAU V. — Proportions relatives des diverses iodoprotéines et distribution de ^{127}I entre elles dans les extraits thyroïdiens de différents Vertébrés inférieurs.

Especes	Proportions relatives des iodoproteines thyroïdiennes solubles en p. cent du total ($TG_1+TG_2+TG_4+TG_6$)*							
	TG_1		TG_2		TG_4		TG_6	
	Proteines	^{127}I	Proteines	^{127}I	Proteines	^{127}I	Proteines	^{127}I
Lamproie marine 6 **	100	nd	0	nd	0	nd	–	–
Petite Roussette								
— Manche 4	16,0	13,4	74,3	77,6	6,8	8,3	–	–
— Mediterranee 5	7,8	5,0	81,8	83,0	7,2	9,3	1,9	2,5
Protoptere 5	2,8	2,8	73,6	79,1	15,4	14,3	7,4	3,9
Saumon atlantique								
— de montee 5	6,8	4,0	69,9	74,5	17,9	17,2	4,8	4,1
— de frayeres 8	9,6	7,3	69,7	72,5	11,0	13,6	9,4	6,2
Truite de mer 2	4,9	3,9	62,6	60,0	20,5	25,7	12,0	12,1
Anguille 2	0	0	80,0	76,6	14,6	17,2	6,3	6,1
Python 1	0	3,4	90,1	82,8	8,3	10,2	1,5	–
Crocodile 1	6,6	14,7	80,6	69,3	12,8	15,9	–	–
Uromastix 7	0	–	97,5	nd	2,5	nd	–	–
Tortue 8	11	nd	85	nd	4	nd	–	–

* Valeurs moyennes déterminées par analyse en gradient de saccharose des extraits thyroïdiens solubles de (n) animaux ; nd, non déterminé ; ** un pic protéique de coefficient de sédimentation 5 S est marqué par l'iode radioactif.

Les teneurs moyennes en thyroglobuline TG_2 et en polymère TG_4 des thyroïdes des divers Poissons étudiés sont données dans le tableau VI. Des variations individuelles importantes sont enregistrées, mais les teneurs moyennes en TG_2 chez les différentes espèces considérées sont plus homogènes (2 à 3 %) que celles du polymère TG_4 (0,2 à 0,8 %).

Tableau VI. — Teneurs moyennes en thyroglobuline TG_2 et en polymère TG_4 des extraits thyroïdiens de diverses espèces de Poissons.

Espèces	Teneurs moyennes des thyroïdes (mg/100 mg de glande fraîche)	
	TG_2	TG_4
Petite Roussette		
— Manche * (60)	1,74	
— Méditerranée (5)	2,58 ± 0,790	0,21 ± 0,025
Protoptère (5)	2,14 ± 0,222	0,44 ± 0,034
Saumon atlantique		
— frayères (14)	2,62 ± 0,223	0,34 ± 0,078
— montée (7)	3,37 ± 0,617	0,86 ± 0,016
Truite de mer (2)	2,02 ± 0,638	0,64 ± 0,024
Truite de rivière * (3)	2,36	0,56
Anguille * (15)	1,74	0,24

(n), nombre d'animaux considérés ; * (n), nombre d'animaux dont les thyroïdes ont été groupées. Ces valeurs sont déterminées par analyse en gradient de saccharose des extraits thyroïdiens solubles, puis dosage des protéines selon Lowry *et al.* (1951).

2. Taux d'iodation moyen des protéines thyroïdiennes

Les teneurs en ^{127}I total des thyroïdes et les taux d'iodation moyens de la thyroglobuline et de ses polymères, exprimés en µg de ^{127}I/100 µg de protéines sont donnés dans le tableau VII.

Tableau VII. — Teneurs en ^{127}I total des thyroïdes et taux d'iodation moyens des diverses iodoprotéines thyroïdiennes.

Espèces	Teneur moyenne en ^{127}I total (µg/100 mg thyroïde fraîche)	Taux d'iodation moyen des protéines thyroïdiennes (en µg ^{127}I/100 µg de protéines)		
		TG_2	TG_4	TG_6
Petite Roussette				
— Manche ** (60)	73,8 ± 13,15	1,47 ± 0,095	—	—
— Méditerranée * (60)	57,0	0,77	0,82	—
Protoptère (5)	42,2 ± 6,39	1,18 ± 0,063	1,05 ± 0,082	0,52
Saumon atlantique				
— de montée (5)	91,6 ± 19,42	1,57 ± 0,056	1,49 ± 0,068	1,27 ± 0,066
— de frayères (14)	38,1 ± 3,70	0,98 ± 0,072	1,03 ± 0,062	0,40 ± 0,083
Truite de mer (2)	65,1 ± 15,15	1,45 ± 0,125	1,79 ± 0,320	1,54 ± 0,235
Truite de rivière * (3)	43,9	1,05	1,12	
Anguille * (15)	24	0,77	1,06	—
(2)	35,6 ± 28,35	0,66	0,85	
Python (1)	37,4	0,35	0,40	
Crocodile (1)	4,0	0,07		

(n), nombre d'animaux ; * (n), nombre d'animaux dont les thyroïdes ont été groupées ; ** (n), les thyroïdes sont réparties en deux groupes.

L'examen de ce dernier montre que :

a — Les teneurs en ^{127}I total varient selon l'espèce considérée et présentent aussi dans certains cas de fortes variations individuelles. Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par Roche *et al.* (1963).

b — Aux teneurs les plus élevées en ^{127}I total des thyroïdes de la Roussette pêchée dans la Manche, du Saumon de montée et de la Truite de mer, capturés au début de leur migration anadrome, correspondent les plus forts taux d'iodation de la thyroglobuline ($\simeq$ 80 at. ^{127}I/molécule pour un poids moléculaire de 670 000) et du polymère TG_4.

c — Chez tous les Poissons étudiés, le taux d'iodation de la thyroglobuline est relativement élevé par rapport à celui de la thyroglobuline des Mammifères. La thyroglobuline des deux Reptiles étudiés est faiblement iodée.

d — Le taux d'iodation du polymère TG_4 est voisin de celui de la thyroglobuline.

e — Il semble exister, chez le Saumon atlantique, des différences intraspécifiques du contenu en iode des glandes et des taux d'iodation des protéines thyroïdiennes qui paraissent liées aux variations de l'état physiologique de l'animal (Lachiver et Martin, 1968). En effet, les tests F de Fischer (tabl. VIII) effectués sur les teneurs en ^{127}I des glandes et sur les taux d'iodation moyens respectifs de TG_2, TG_4, TG_6 mettent en évidence l'existence de variations très hautement significatives ($p < 0{,}01$) de ces paramètres entre les Saumons d'hiver et de printemps, et leur absence entre les Saumons de deux hivers différents ($p > 0{,}05$). En revanche, les teneurs en TG_2 ne présentent pas de variation globale significative entre les deux saisons considérées, ceci provenant d'une forte variabilité annuelle et individuelle.

Tableau VIII. — Taux d'iodation des protéines thyroïdiennes et teneur en iode de la thyroïde des Saumons de frayères (hiver) et de montée (printemps).

Saumons	Taux d'iodation moyens			Teneurs moyennes (en ^{127}I µg/100 mg de glande fraîche)	Analyse de variance
	TG_2	TG_4	TG_6		
Hiver 67-68	(7) 1,08 ± 0,082	(7) 1,08 ± 0,096	(7) 0,46 ± 0,109	(7) 41,8 ± 4,856	p > 0,05
Hiver 68-69	(7) 0,88 ± 0,111	(5) 0,94 ± 0,054	(5) 0,30 ± 0,130	(7) 34,0 ± 5,621	
Moyenne des 2 hivers	(14) 0,98 ± 0,072	(12) 1,03 ± 0,062	(12) 0,40 ± 0,083	(14) 38,1 ± 3,701	p < 0,01
Printemps 68	(5) 1,57 ± 0,056	(5) 1,49 ± 0,068	(5) 1,27 ± 0,066	(5) 91,6 ± 19,421	

(n), nombre d'animaux étudiés ; ± Sm, erreur standard de la moyenne.

Chez le Saumon atlantique, les différences entre les teneurs en ^{127}I des thyroïdes aux deux étapes du cycle vital étudiées semblent donc résulter d'une diminution chez le Saumon de frayères, en hiver, du taux d'iodation de chaque entité protéique plutôt que d'un changement dans les quantités de ces iodoprotéines.

Chez les Roussettes pêchées en Méditerranée, les teneurs en iode des glandes et surtout le taux d'iodation moyen de la thyroglobuline sont significativement inférieurs à ceux des Roussettes provenant de la Manche. Salvatore *et al.* (1965*c*) ont déterminé un taux d'iodation égal à 0,50 pour la thyroglobuline d'une espèce de Sélacien très voisine (*Scyliorhinus stellaris* L.) également originaire de Méditerranée.

Discussion

Analogie du spectre des iodoprotéines thyroïdiennes dans la série des Vertébrés

Les extraits thyroïdiens des divers Vertébrés inférieurs étudiés, appartenant aux classes des Cyclostomes, Chondrichthyens, Osteichthyens et Reptiles, contiennent en proportions variables des iodoprotéines solubles, de poids moléculaires différents, que nous avons nommées TG_1, TG_2, TG_4 et TG_6 par ordre croissant de coefficient de sédimentation. L'analogie, en particulier des spectres d'ultracentrifugation de ces protéines et de ceux des protéines thyroïdiennes mammaliennes, permet de penser qu'elles correspondent respectivement à la 12, 19, 27 et 32 S des Mammifères.

Des données semblables ont été obtenues par Salvatore *et al.* (1965*c*), puis par Roche *et al.* (1968) pour cinq autres espèces de Vertébrés inférieurs.

Ces résultats suggèrent que dans l'ensemble de l'échelle phylogénique des Vertébrés, des plus primitifs (Cyclostomes) aux plus évolués (Mammifères), les iodoprotéines thyroïdiennes présentent une organisation moléculaire similaire.

— Chez les Vertébrés inférieurs, à l'exception du cas de la Lamproie, la thyroglobuline native ou TG_2, dont le coefficient de sédimentation est voisin de 19 S mais diffère selon l'espèce considérée (Lachiver *et al.*, 1965 ; 1966), représente comme chez les Mammifères le principal constituant protéique (de 60 à 95 %). La teneur moyenne en thyroglobuline des thyroïdes des Poissons étudiés est égale à 2 ou 3 % du poids frais environ.

— Chez la Lamproie marine (*Petromyzon marinus* L.) la TG_2 native n'existe qu'à l'état de traces ; par contre deux composés protéiques marqués par l'iode radioactif, de coefficient de sédimentation voisins de 5 et 12 S, sont mis en évidence. Aloj *et al.* (1967) ont obtenu des résultats analogues pour une espèce de Cyclostome voisine : *Lampetra fluviatilis*, et ont suggéré que la protéine 5 S marquée par le radioiode pouvait être une sous-unité de la thyroglobuline et correspondre au composé 8 S obtenu par de Crombrugghe *et al.* (1966), après réduction des liaisons disulfures intracaténaires dans la thyroglobuline bovine.

— Le ou les polymères TG_4 et TG_6 sont présents dans les extraits thyroïdiens des divers Poissons et Reptiles étudiés et atteignent un pourcentage important (≥ 20 %) chez les Actinoptérygiens.

— S'il est probable que la thyroglobuline TG_2 et le polymère TG_4, qui sont mis en évidence dans la plus grande majorité des cas, existent réellement à l'état natif dans la colloïde des vésicules thyroïdiennes, la présence irrégulière et occasionnelle de la protéine iodée TG_1 est très sujette à controverses tant chez les Mammifères que chez les Vertébrés inférieurs. En effet, représente-t-elle le précurseur de la TG_2, existant à l'état stable et susceptible de s'ioder, ou n'est-elle qu'un produit de dissociation de la TG_2 ?

Le même problème se posera pour la protéine néosynthétisée in vitro en présence de ^{3}H-Tyr, et nous en discuterons plus loin.

Proportions relatives des diverses iodoprotéines et signification physiologique

Quelle que soit l'origine de la protéine TG_1, peut-on attribuer une signification fonctionnelle à la répartition des diverses iodoprotéines ?

Roche *et al.* (1968) notent que les extraits thyroïdiens de cinq espèces de Vertébrés inférieurs semblent contenir moins de protéine 27 S que ceux de divers Mammifères, et que la protéine 12 S, souvent identifiée dans les thyroïdes des premiers, ne l'est que très rarement dans celles des Mammifères. De plus, Salvatore *et al.* (1965*b*,*c*) constatent, lorsque des variations intraspécifiques de la teneur en 27 S sont observées, que les thyroïdes, d'après leur étude histologique, sont d'autant plus actives qu'elles contiennent davantage de 27 S. Pour ces auteurs, une proportion élevée de ce polymère dans les extraits thyroïdiens constituerait donc un critère positif d'intensité du fonctionnement thyroïdien. En revanche, la présence de l'iodoprotéine 12 S chez les Vertébrés inférieurs et son importance chez le Cobaye, dont on considère la thyroïde comme peu active, serait un signe d'hypoactivité des glandes chez ces animaux.

Cependant, les résultats que nous avons obtenus pour d'autres espèces de Poïkilothermes ne confirment pas ces hypothèses. En effet, d'une part nous avons constaté que les proportions des polymères TG_4 et TG_6 chez les Poissons, loin d'être inférieures à celles trouvées chez les Mammifères, leur sont souvent supérieures. D'autre part, le composé iodé $TG_1 \simeq$ 12 S n'est pas mis en évidence à l'état stable chez l'Anguille, l'Uromastix, le Python, et seulement en faible pourcentage et occasionnellement chez d'autres espèces (Protoptère, Truite de rivière). Inversement, une proportion toujours importante de 12 S iodée est mise en évidence chez le Lérot (*Elyomis quercinus* L.) en hibernation ou avant l'automne (Lachiver et Fontaine, 1964 ; Lachiver *et al.*, 1965) et au cours des réveils périodiques, phases pendant lesquelles l'activité thyroïdienne est très élevée relativement à celle du Cobaye. Par ailleurs, bien que l'intensité du fonctionnement thyroïdien du Saumon de montée soit très supérieure à celle du Saumon sur les frayères (Fontaine et Leloup, 1962), les proportions relatives des différentes iodoprotéines sont sensiblement identiques à ces deux stades du cycle vital.

Plusieurs expérimentations ont été réalisées afin d'étudier l'influence de l'axe hypophysothyroïdien sur la distribution des protéines thyroïdiennes. Nous savons que la TSH accélère les diverses étapes du métabolisme iodé et qu'elle semble stimuler aussi la synthèse de la thyroglobuline chez le Rat (Rappaport, 1970). L'hypophysectomie de Rats (Fontaine et Lachiver, 1964) ou l'immunisation de Lapins contre la TSH bovine (Lachiver *et al.*, 1969) entraîne relativement aux témoins un ralentissement important de l'organifi-

cation de l'iodure et une augmentation significative de la quantité de matériel colloïdal dans les follicules, sans que le spectre des iodoprotéines soit modifié. Chez des Anguilles hypophysectomisées depuis 4 mois, le renouvellement de l'iode est également ralenti, mais les proportions des divers composés protéiques et des pics radioactifs sont semblables à celles observées chez les Anguilles témoins (données inédites). En accord avec l'ensemble de ces résultats, SALVATORE *et al.* (1965*c*) ont constaté que chez des Cobayes traités par TSH, l'organification de l'iodure radioactif est accélérée, mais que sa distribution entre les protéines thyroïdiennes n'est pas affectée.

Il ne semble donc pas valable de juger de l'intensité du fonctionnement thyroïdien en considérant les proportions relatives des iodoprotéines thyroïdiennes. Par ailleurs, ROCHE *et al.* (1968) et SALVATORE (1969) attribuent une signification d'évolution à la présence de 12 S, cette protéine représentant le principal constituant protéique de la thyroïde chez les Vertébrés les plus primitifs (Cyclostomes) et étant identifiée préférentiellement, d'après ces auteurs, chez les Vertébrés inférieurs. Mais nos résultats montrent qu'il est prématuré, dans l'état actuel de nos connaissances, d'établir une relation entre le degré d'évolution des différentes classes de Vertébrés en fonction de la présence ou de l'absence de la protéine $TG_1 \simeq 12$ S.

Taux d'iodation des protéines thyroïdiennes

La thyroglobuline des divers Poissons étudiés présente un degré d'iodation élevé, souvent voisin ou supérieur à 1 %. Les taux d'iodation moyens de la thyroglobuline de différentes espèces de Mammifères, rapportés par divers auteurs, présentent des valeurs maximales de 1,1 % mais sont le plus souvent compris entre 0,20 et 0,70 % (ROLLAND *et al.*, 1970). Les teneurs en iode correspondant à 80 at. ^{127}I/molécule, déterminées chez certains Poissons (Saumon, Roussette atlantique) vivant dans leur environnement naturel, ne sont atteints chez les Mammifères qu'après iodation chimique (EDELHOCH et LIPPOLDT, 1962) ou enzymatique (NUNEZ *et al.*, 1966 ; DE CROMBRUGGHE *et al.*, 1967 ; TARUTANI et UI, 1969*a*).

Par ailleurs, en accord avec les résultats de LISSITZKY *et al.* (1965), et non avec ceux de SALVATORE *et al.* (1965*a*), de ROBBINS *et al.* (1966), et de ROCHE *et al* (1968), le polymère $TG_4 \simeq 27$ S présente un degré d'iodation du même ordre de grandeur que celui de TG_2, tant chez les divers Poissons que chez les Mammifères que nous avons étudiés (Bœuf, Rat). Ce désaccord apparent concernant la richesse relative en iode du polymère $\simeq 27$ S peut résulter de différences méthodologiques et de variations selon les animaux étudiés. ROCHE *et al.* (1968) n'observent pas régulièrement pour une espèce donnée que le polymère 27 S présente une teneur en iode très supérieure à celle de la TG 19 S. Ainsi les polymères sans nous paraître avoir le privilège d'être proportionnellement deux à trois fois plus riches en iode que la thyroglobuline peuvent néanmoins constituer une réserve d'iode non négligeable pour la synthèse hormonale, tout particulièrement dans le cas des Poissons où la proportion de polymère est importante.

Quels sont les facteurs susceptibles d'être responsables des taux d'iodation élevés des protéines thyroïdiennes chez les diverses espèces de Poissons étudiés ?

En première approximation, le degré d'iodation de la thyroglobuline peut varier en

fonction de l'apport iodé à la thyroïde et de la vitesse de renouvellement de cette protéine. Par exemple, le taux d'iodation de la thyroglobuline de Rats nourris d'un régime carencé en iode (0,03 µg ^{127}I/g), dont l'activité thyroïdienne est très intense, est de 0,2 %, alors qu'il atteint 1,1 % pour des Rats soumis à un régime riche en iode (0,6 µg ^{127}I/g) (Lachiver, données inédites).

Plusieurs hypothèses peuvent donc être formulées :

1. Chez les Vertébrés aquatiques, le milieu extérieur constitue une source potentielle d'iodure. Leloup (1970) a montré que, si l'iodurémie des Téléostéens d'eau douce est élevée, même chez des espèces soumises à un jeûne physiologique prolongé comme l'Anguille ou le Saumon atlantique au cours de sa migration anadrome, c'est grâce à l'existence au niveau branchial d'un transport actif de l'iodure à partir du milieu extérieur. L'iodurémie atteint des valeurs maximales chez les Téléostéens Clupéiformes migrateurs amphihalins (Fontaine, 1970), par suite de la présence dans leur plasma d'une protéine liant l'iodure (Fontaine et Leloup, 1958 ; Leloup, 1964*b*), appelée iodurophorine.

L'iodurémie élevée chez ces Poissons peut donc vraisemblablement assurer un apport d'iode important à la thyroïde.

La diminution de la teneur en iode de chaque entité protéique du Saumon de montée au Saumon de frayères peut s'expliquer par une chute de l'iodurémie, elle-même due à une moindre capacité de liaison de l'iodure par l'iodurophorine, concomitante d'une réduction du pouvoir de concentration de l'iodure par la thyroïde (Fontaine et Leloup, 1962). Toutefois, le mécanisme de concentration des iodures par la branchie assure leur apport de façon à maintenir un taux d'iodation encore élevé des protéines thyroïdiennes et à subvenir à la biosynthèse hormonale. Dans ce cas, les variations du taux d'iodation des protéines thyroïdiennes semblent donc être en relation avec l'état physiologique des animaux.

2. Un renouvellement plus lent de la thyroglobuline chez les Poissons permettrait l'iodation d'un plus grand nombre de résidus tyrosyls et serait responsable du taux d'iodation élevé de cette protéine, même chez des espèces d'eau douce comme le Protoptère dont l'iodurémie est aussi faible que celles des Mammifères et des Oiseaux (Leloup, 1970).

Des variations dans la vitesse du renouvellement de la thyroglobuline, en fonction de certains facteurs écologiques (température du milieu ambiant, alimentation), pourraient aussi être impliquées dans les différences du taux d'iodation entre les thyroglobulines des Roussettes pêchées en Manche et celles des Poissons de même espèce capturés en Méditerranée alors que les uns et les autres vivent dans des milieux marins dont les teneurs en iode sont similaires ($\simeq$ 51 µg ^{127}I/l), et présentent sensiblement la même iodurémie.

3. L'analyse des acides aminés des thyroglobulines des Poissons étudiés montre que le pourcentage de tyrosine varie peu et est voisin de celui déterminé pour les thyroglobulines de Mammifères, mais suggère que cette macromolécule protéique ne présente pas une structure identique chez les diverses espèces étudiées. S'il en est ainsi on peut envisager que certaines différences dans la structure primaire et tertiaire de cette protéine sont susceptibles de rendre les résidus tyrosyls plus ou moins accessibles à l'iodation.

II. BIOSYNTHÈSE IN VITRO DES PROTÉINES THYROÏDIENNES CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES DE POISSONS

Au cours de ces dernières années, les différentes étapes de la biosynthèse de la thyroglobuline dans la thyroïde des Mammifères ont été étudiées.

Divers auteurs ont montré in vitro (Seed et Goldberg, 1963,1965*a* ; Lissitzky *et al.*, 1964 ; Nunez *et al.*, 1965*a*), puis in vivo (Vecchio *et al.*, 1966*b* ; Cavalieri et Searle, 1967*a* ; Ekholm et Strandberg, 1967*a,b* ; Nunez et *al.*, 1967*a*) que les acides aminés marqués sont incorporés dans des protéines de coefficient de sédimentation 3-8 S et 12 S, avant de l'être dans une protéine non iodée, nommée préthyroglobuline (Nunez *et al.*, 1965*a*) dont la vitesse de sédimentation est sensiblement inférieure à celle de la thyroglobuline native (19 S).

Toutefois, la relation précurseur à produit entre ces composés de faible poids moléculaire et la thyroglobuline, que semblaient mettre en évidence les études cinétiques précitées, a été récemment remise en question par les travaux de Schneider *et al.* (1970,1971). Vecchio *et al.* (1971) pensent, par voie de conséquence, que les protéines 6 S, 7 S et 12 S peuvent provenir de la dissociation des molécules de thyroglobuline néosynthétisées et peu iodées n'ayant pas encore acquis leur configuration la plus stable.

Par ailleurs, il est bien établi que les processus de biosynthèse protéique sont indépendants de ceux de l'iodation (Lissitzky *et al.*, 1964 ; Maloof *et al.*, 1964 ; Seed et Goldberg, 1965*a,b* ; Tishler et Ingbar, 1965 ; Nunez *et al.*, 1965*a,b*). En effet, la présence in vitro ou in vivo de puromycine inhibe totalement la synthèse de thyroglobuline, sans affecter l'iodation des molécules préformées. Inversement, la présence d'antithyroïdiens, inhibiteurs spécifiques de l'iodation, n'affecte pas la synthèse des chaînes précurseurs et leur polymérisation, ni l'incorporation des glucides (Herskovics, 1969).

L'ensemble des études cinétiques de l'incorporation des acides aminés et sucres marqués, et de l'iode radioactif dans les thyroïdes des Mammifères montre que le squelette peptidique de cette glycoprotéine est synthétisé avant l'addition séquentielle des sucres (Spiro et Spiro, 1966 ; Cheftel et Bouchilloux, 1968*a,b* ; Whur *et al.*, 1969 ; Haddad *et al.*, 1971), qui elle-même semble précéder l'iodation (Herskovics, 1969).

Nous avons montré que les protéines iodées thyroïdiennes chez les Vertébrés inférieurs présentaient une organisation moléculaire similaire de celle observée chez les Mammifères. Nous nous sommes ensuite proposée d'étudier la biosynthèse de ces protéines et de son contrôle chez les Poissons. La synthèse de la thyroglobuline chez ces Poïkilothermes procédait-elle selon un schéma identique à celui décrit chez les Mammifères et quels étaient les facteurs susceptibles de la réguler ou de l'influencer ?

Chez les Mammifères, la synthèse protéique thyroïdienne est contrôlée par l'axe hypophyso-thyroïdien. L'hormone thyréotrope (TSH), injectée in vivo, accélère l'incorporation in vitro et in vivo des acides aminés dans les protéines thyroïdiennes (Ragupathy *et al.*, 1963 ; Bradley et Wissig, 1966 ; Ekholm et Strandberg, 1966 ; Cavalieri et Searle, 1967*b* ; Pavlovic-Hournac *et al.*, 1967) et semble exercer une action sélective

sur la synthèse de thyroglobuline (RAPPAPORT, 1970). Par ailleurs, HEYWOOD (1966) montre que la thyroxine et l'iode inorganique de la glande sont susceptibles d'intervenir dans la régulation de l'incorporation des acides aminés dans les protéines thyroïdiennes en l'inhibant au niveau ribosomal.

Le contrôle de la fonction thyroïdienne chez les Poissons a fait l'objet de diverses études. La compilation des données obtenues (GORBMAN, 1969) permet de penser, du moins pour les Téléostéens, que l'activité thyroïdienne est contrôlée par la glande pituitaire et la TSH (FONTAINE *et al.*, 1953*b* ; PICKFORD, 1959 ; DODD et MATTY, 1964). A côté de cette régulation intrinsèque par l'axe hypophyso-thyroïdien, d'autres facteurs externes liés à l'environnement, en particulier la température, sont susceptibles de modifier le fonctionnement thyroïdien chez les Poïkilothermes.

Les données obtenues chez diverses espèces de Poissons, relatives aux variations de l'activité thyroïdienne en fonction de la température, sont sujettes à controverses (DRURY et EALES, 1968). D'après les critères histologiques, une augmentation de la température environnante peut diminuer l'activité thyroïdienne (FONTAINE *et al.*, 1953*a*, *b* ; IVANOVA, 1954 ; OLIVEREAU, 1955*a* ; EALES, 1964, 1965 ; SWIFT, 1959 ; DRURY et EALES, 1968), ne pas la modifier (OLIVEREAU, 1955*b*, *c*) ou la stimuler (BARRINGTON et MATTY, 1954 ; FORTUNE, 1955). Cependant l'utilisation des isotopes radioactifs de l'iode met le plus généralement en évidence une influence positive de la température sur le métabolisme iodé thyroïdien des Poissons : la vitesse de fixation et d'organification de l'iodure ainsi que celle de la sécrétion des hormones thyroïdiennes croissent avec la température (GORBMAN et BERG, 1955 ; FONTAINE et FONTAINE, 1957 ; LELOUP, 1958 ; LELOUP et FONTAINE, 1960 ; DRURY et EALES, 1968 ; SMITH et EALES, 1971).

Ces diverses données nous ont conduite à étudier, chez quelques Poissons présentant des exigences thermiques bien différentes, l'influence de la température in vitro sur la biosynthèse de la thyroglobuline qui constitue également un aspect fondamental de l'activité thyroïdienne (BRISSON-MARTIN et LACHIVER, 1972*a*).

A. — ÉTUDE QUALITATIVE DES PROTÉINES SOLUBLES SYNTHÉTISÉES IN VITRO DANS LA THYROÏDE DES POISSONS

Cette étude a été réalisée chez trois Téléostéens (Saumon, Truite, Anguille) et un Dipneuste (Protoptère). L'expérimentation a porté sur des animaux de grande taille chez lesquels le tissu thyroïdien peut être prélevé à l'état pur.

Les nodules thyroïdiens des Téléostéens et la thyroïde du Protoptère sont incubés en présence de L 3-5 $^3H_2$-Tyrosine (^{3}H-Tyr) pendant 2, 6 ou 24 heures dans du milieu de Campagne et Grüber (voir Techniques).

Chez les Mammifères, la thyroglobuline synthétisée in vitro à 38°C en présence d'acides aminés marqués est principalement identifiée par sa vitesse de sédimentation en gradient de saccharose et ses limites de précipitation par le sulfate d'ammonium (1,4 M — 1,8 M). La précipitation de cette protéine par un antisérum antithyroglobulinique constitue également un excellent critère d'identification (SEED et GOLDBERG, 1963, 1965*a* ; LISSITZKY *et al.*, 1965). Les comportements en chromatographie sur DEAE-cellulose, en filtration sur gel G-200 du matériel néosynthétisé ont aussi été étudiés.

Dans ce travail, les propriétés de sédimentation et de précipitation par le sulfate d'ammonium ont essentiellement servi à caractériser la thyroglobuline néosynthétisée dans les thyroïdes des Poissons. En raison de la faible quantité de matériel disponible, des antisérums antithyroglobulines de Poissons n'ont pu être préparés.

Après dialyse des homogénats thyroïdiens contre le tampon phosphate standard (pH = 7,4 ; μ : 0,15) et élimination des particules, les protéines solubles marquées par ^{3}H-Tyr sont analysées à 5°C en gradient de saccharose (5-20 %).

Les coefficients de sédimentation de ces protéines tritiées sont déterminés en prenant pour référence une thyroglobuline purifiée de Bœuf, 19 S, marquée in vitro par ^{125}I et éga-

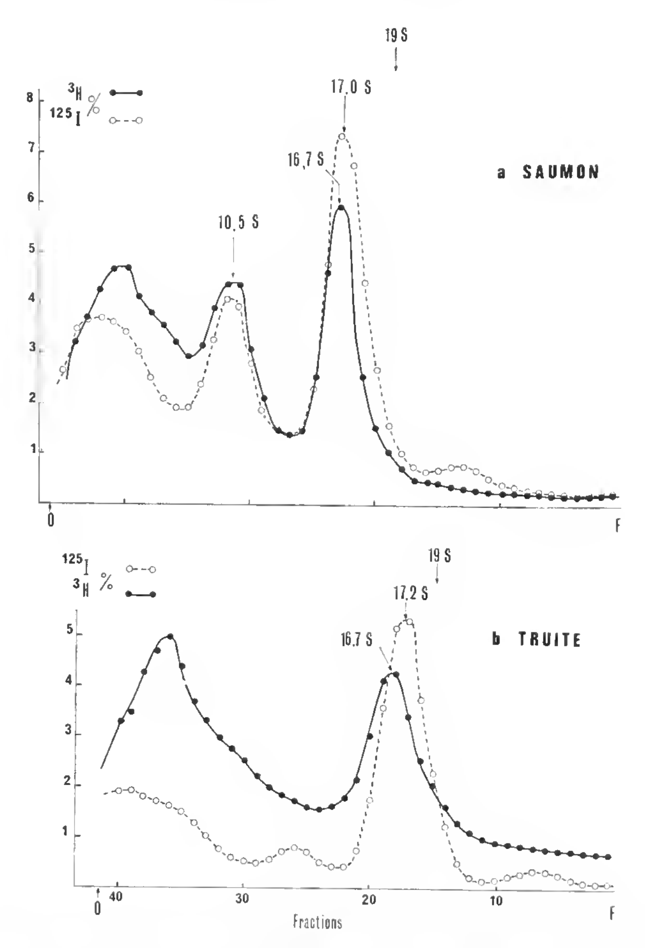


Fig. 5. — *Ultracentrifugation en gradient de saccharose des protéines solubles marquées in vitro par ^{3}H-Tyr ou ^{125}I dans les thyroïdes de Saumon et de Truite.*

Incubations réalisées à 15°C, séparément en présence de ^{3}H-Tyr ou de ^{125}I, pendant 24 h (a) et 6 h (b). 80 µl d'extrait thyroïdien marqué par ^{3}H et 20 µl de celui marqué par ^{125}I sont centrifugés pendant 3 h 30 à 48 000 tpm. Radioactivités en ^{3}H et ^{125}I exprimées en pour cent des radioactivités déposées sur le gradient.

lement pour chaque espèce par rapport à leur propre thyroglobuline marquée in vitro ou in vivo par ^{125}I.

Les profils des gradients obtenus (fig. 5, 6) montrent que la radioactivité se distribue entre trois fractions d'importance inégale :

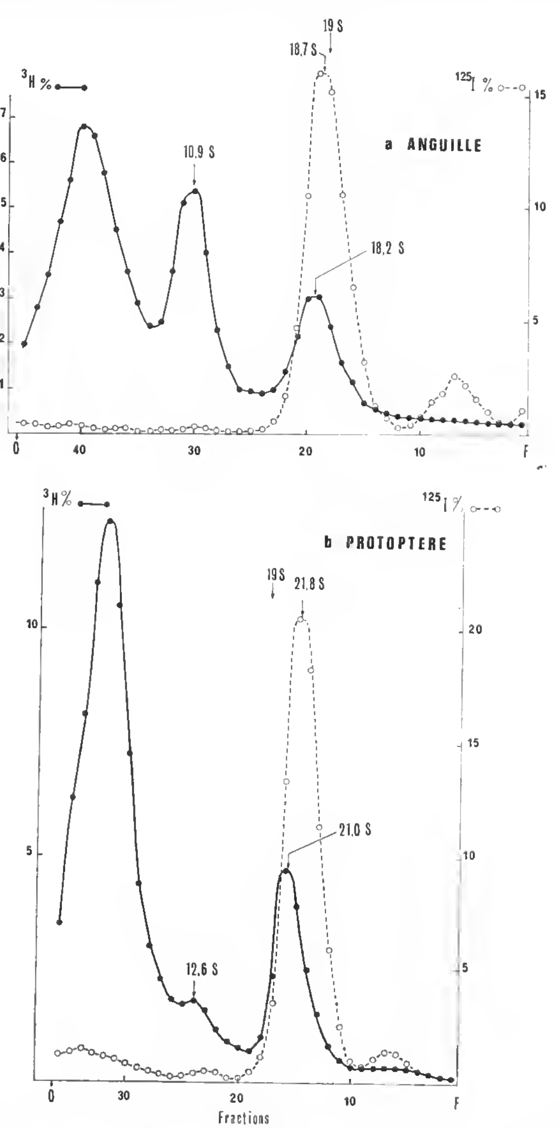


FIG. 6. — *Ultracentrifugation en gradient de saccharose des protéines solubles marquées in vitro par ^{3}H-Tyr ou in vivo par ^{125}I dans les thyroïdes d'Anguille et de Protoptère.*
Les thyroïdes de certains animaux sont incubées à 30°C, en présence de ^{3}H-Tyr, pendant 6 h. Les protéines thyroïdiennes d'autres animaux sont marquées in vivo par ^{125}I pendant 8 jours (a) et 17 h (b). 80 µl d'extrait thyroïdien marqué in vitro par ^{3}H et 20 µl de celui marqué in vivo par ^{125}I sont analysés. Ultracentrifugation : 5 h 30 à 39 000 tpm (a) ; 2 h 15 à 65 000 tpm (b).

a — La fraction protéique qui migre le plus rapidement présente dans le cas de chaque espèce un coefficient de sédimentation voisin et légèrement inférieur à celui de la thyroglobuline correspondante marquée par ^{125}I. Les différences interspécifiques entre les valeurs obtenues seront discutées dans la 4e partie.

Pour chaque espèce, les vitesses de sédimentation des protéines marquées par ^{3}H-Tyr sont identiques, que les incubations de thyroïdes soient réalisées en présence ou non de propylthiouracile (1 mM), inhibiteur de l'iodation (fig. 7).

Après isolement de cette fraction protéique par centrifugation en gradient de saccharose (Rotor SW 50), 90 % de la radioactivité qui lui est liée est précipitée entre 1,4 et 2,2 M de sulfate d'ammonium à 5°C. Cette protéine tritiée ainsi purifiée présente un coefficient

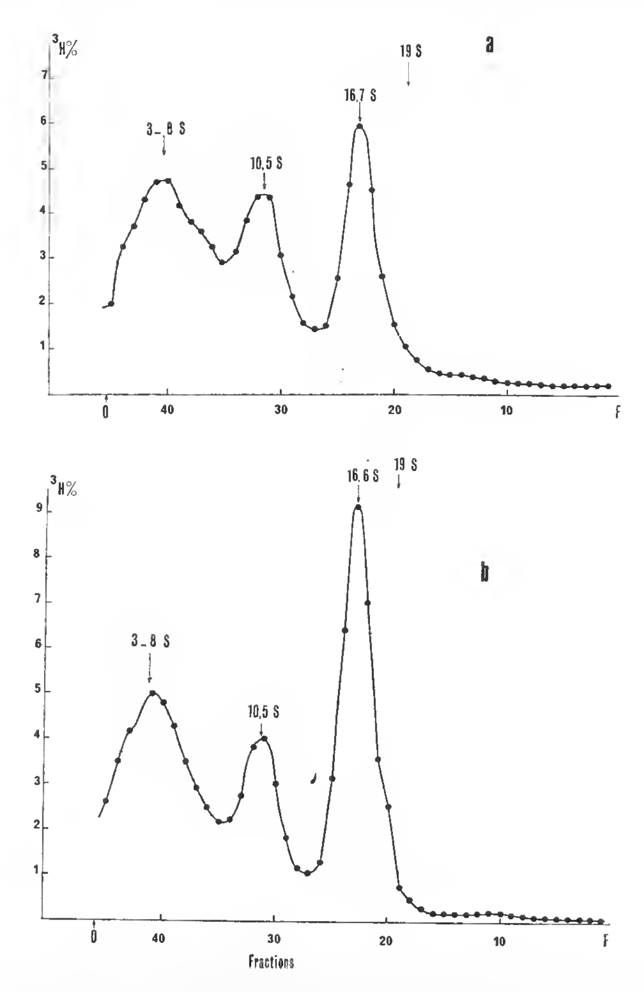


FIG. 7. — *Profils d'ultracentrifugation et coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes de Saumon marquées in vitro par ³H-Tyr.*
Incubations réalisées à 15°C pendant 24 h en présence de propylthiouracile et de perchlorate de sodium (a) ou en absence d'antithyroïdiens (b).

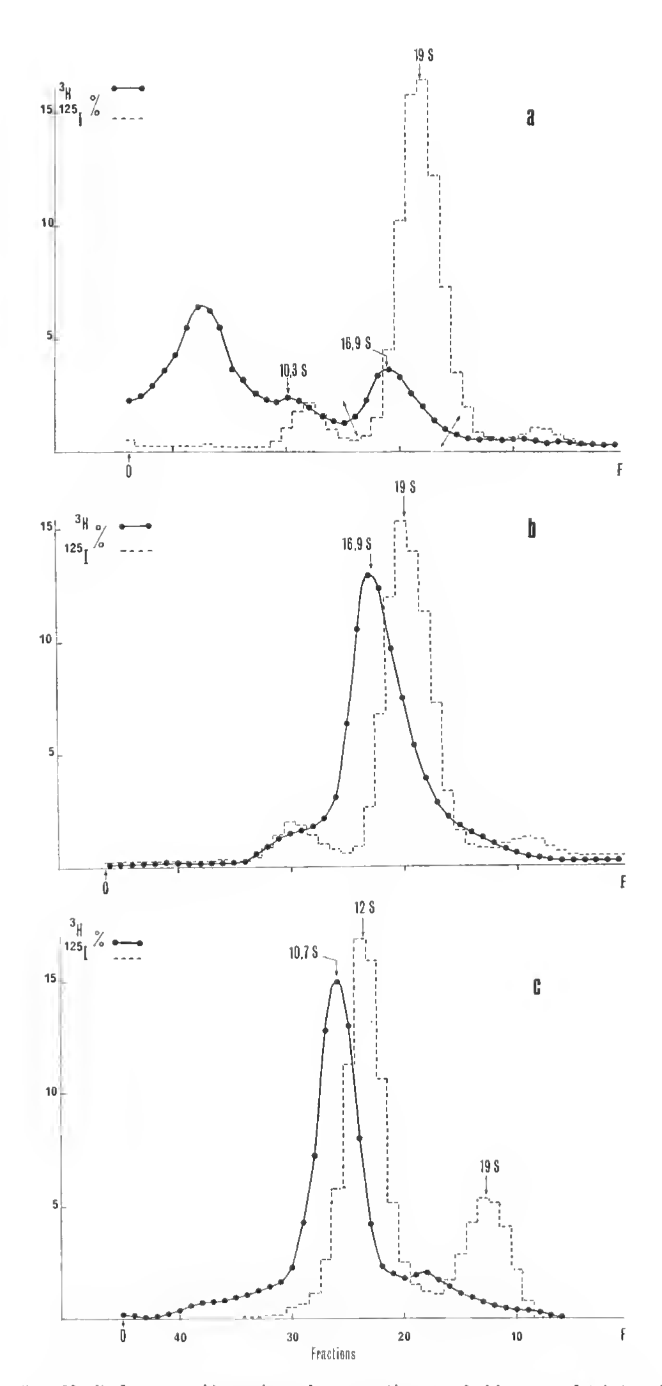


Fig. 8. — a : *Profil d'ultracentrifugation des protéines solubles synthétisées in vitro à 15°c dans la thyroïde de Saumon en présence de ^{3}H-Tyr.*

80 µl d'extrait thyroïdien de Saumon, marqué par ^{3}H, et 20 µl d'une solution de ^{125}I TG de Bœuf (19 S) sont centrifugés à 48 000 tpm, pendant 3 h 30.

b : *Profil d'ultracentrifugation de la thyroglobuline néosynthétisée, marquée par ^{3}H (préTG) après purification sur gradient de saccharose (5-20 % ; rotor SW 50) et relargage au sulfate d'ammonium entre 1,4 et 2,2 M.*

La solution de préTG purifiée est analysée en gradient de saccharose dans les conditions de la figure 8 a.

c : *Dissociation par le SDS de la thyroglobuline néosynthétisée de Saumon, préalablement purifiée.*

80 µl de la solution de préTG purifiée, traitée par du SDS (concentration finale 1,5 × 10^{-3} M ; 1 h à 20°C), et 20 µl d'une solution contenant de la thyroglobuline 19 S de Bœuf marquée par ^{125}I et sa sous-unité 12 S obtenue par dissociation préalable par du SDS, sont centrifugés pendant 4 h à 65 000 tpm.

de sédimentation identique à celui déterminé à partir de l'extrait thyroïdien soluble total (fig. 8 a et b).

Ces diverses données, par analogie avec celles obtenues chez les Mammifères, suggèrent que cette protéine correspond à la préthyroglobuline (préTG) des Mammifères.

b — Une autre fraction protéique, dont la proportion est très variable, est séparée dans les extraits thyroïdiens de certaines espèces. Elle sédimente comme la sous-unité marquée in vitro par ^{125}I de la thyroglobuline (fig. 5 a) et comme la sous-unité obtenue par dissociation par le docécyl sulfate de sodium de la préTG purifiée (fig. 8 c).

c — Enfin un composé de plus faible poids moléculaire migre en front de gradient dans la zone 3-8 S. Une proportion toujours importante de la radioactivité lui est liée (fig. 5 et 6).

B. — Influence de la température d'incubation sur la biosynthèse des protéines thyroïdiennes

1. Biosynthèse protéique totale

La biosynthèse protéique totale est évaluée à partir d'une fraction aliquote de l'homogénat thyroïdien :

— en mesurant la radioactivité qui est liée aux protéines totales néosynthétisées, précipitées par l'acide trichloracétique selon Allen et Schweet (1962) ;

— en déterminant par chromatographie sur papier en butanol-acide acétique-eau (78 — 5 — 17 v/v) l'incorporation de ^{3}H-Tyr dans les protéines thyroïdiennes, en pour cent de la radioactivité totale ajoutée au milieu d'incubation.

Le tissu thyroïdien prélevé puis incubé présentant un degré d'homogénéité et de pureté satisfaisant, ces valeurs peuvent être rapportées à 100 mg de tissu thyroïdien ou à 100 mg de protéines totales.

Chez les diverses espèces de Téléostéens étudiés, l'incorporation totale de ^{3}H-Tyr dans les nodules thyroïdiens augmente avec la durée d'incubation de 6 à 24 heures (tabl. IX). Par ailleurs, la présence de propylthiouracile (1 mM) et de perchlorate de sodium (2 mM) dans le milieu d'incubation inhibe à 96 % l'organification de l'iodure, mais n'affecte pas l'incorporation de ^{3}H-Tyr dans la thyroïde. Celle-ci est donc indépendante des processus de l'iodation.

Tableau IX. — Incorporation globale de ^{3}H-Tyr dans les nodules thyroïdiens de trois Téléostéens en fonction de la durée d'incubation.

Espèces	% ^{3}H-Tyr incorporés/100 mg tissu thyroïdien	
	6 h	24 h
Saumon	6,3	14,9
Truite	4,8	33,5
Anguille	9,3	33,8

Incubations à 15°C en présence de : 50 µg de ^{3}H-Tyr (0,44 C/mmole) dans le cas du Saumon ; 13 µg de ^{3}H-Tyr (6,8 C/mmole) dans le cas de la Truite ; 30 µg de ^{3}H-Tyr (0,44 C/mmole) dans le cas de l'Anguille.
Incorporations déterminées par chromatographie sur papier.

L'étude histologique des thyroïdes de Truite et d'Anguille montre que dans les conditions expérimentales adoptées la structure folliculaire est bien conservée après 24 h d'incubation à 20°C, température physiologique pour ces Téléostéens (fig. 9 a, b ; 10 a, b). Par contre, la structure spécifique du tissu thyroïdien de Truite et d'Anguille n'est que partiellement bien préservée après 6 h d'incubation à 30 et 38°C respectivement (fig. 11 a, 12 a). Après 24 h à ces températures d'incubation élevées, les cellules thyroïdiennes sont lysées : les membranes cytoplasmiques sont déchirées et les noyaux pycnotiques sont rejetés dans les vésicules colloïdes (fig. 11 b, 12 b).

Ceci nous a conduite à étudier préférentiellement l'influence de la température sur la synthèse des protéines thyroïdiennes après 6 h d'incubation.

Des expériences préliminaires réalisées à 15 et 30°C (Lachiver et Martin, 1967 ; Martin et Lachiver, 1968) suggéraient que l'intensité de la biosynthèse protéique thyroïdienne variait avec la température d'incubation et différemment selon l'espèce étudiée. Cependant une influence quantitative de ce facteur était difficile à mettre en évidence pour plusieurs raisons :

a — Les incorporations de ^{3}H-Tyr dans les thyroïdes présentent de plus importantes variations individuelles chez des animaux capturés dans leur environnement naturel, que chez des animaux élevés en laboratoire dans des conditions standard. Pour une même espèce, l'activité thyroïdienne des Poissons utilisés peut varier aussi d'une expérimentation à une autre, en fonction de la saison à laquelle ils sont étudiés. De plus, des différences dans le degré de stimulation de la thyroïde par l'hormone thyréotrope peuvent entraîner des modifications de la teneur en tyrosine libre de la glande (Melmon *et al.*, 1964) et donc de l'activité spécifique réelle de la ^{3}H-Tyr.

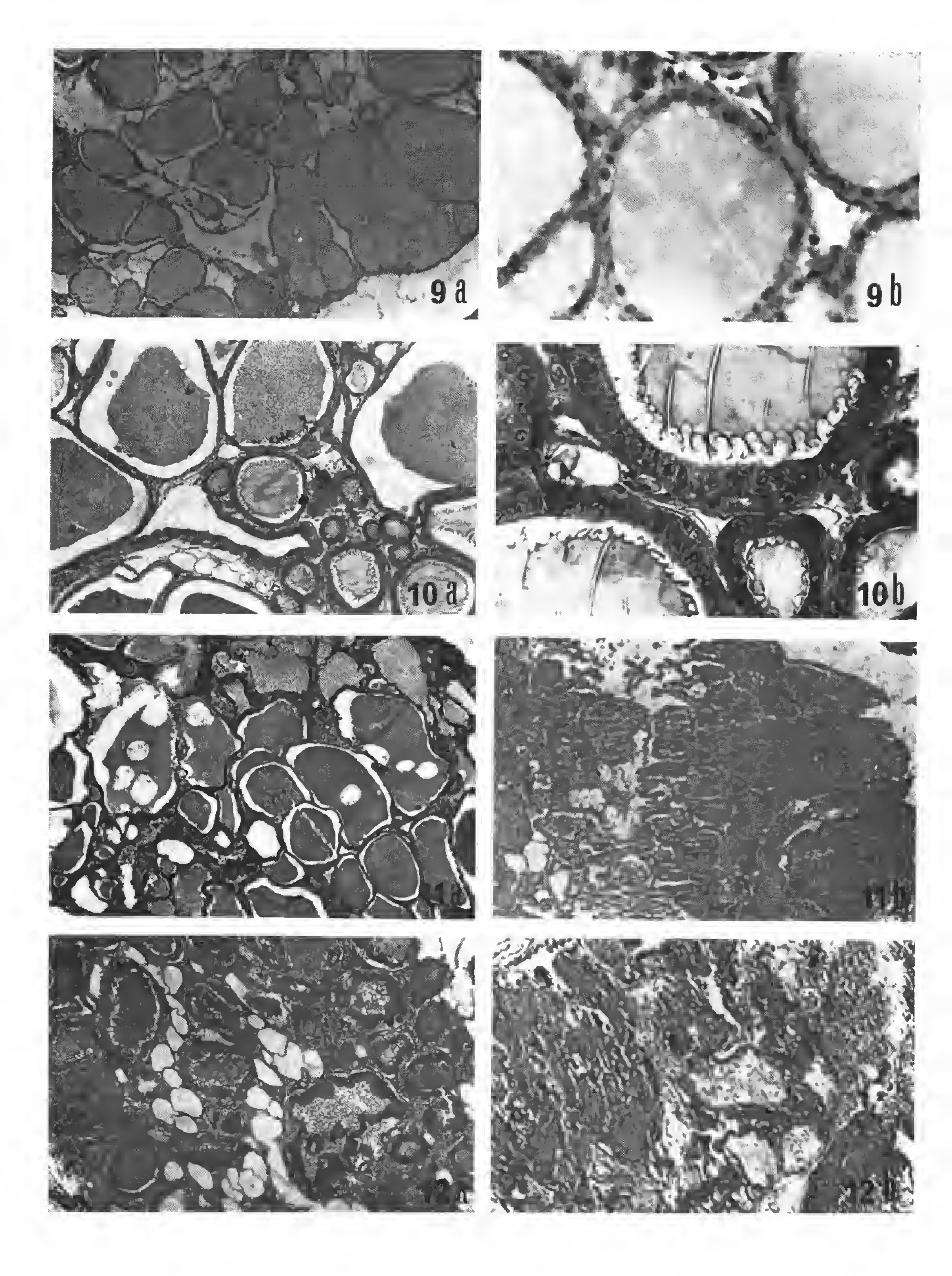
b — Les thyroïdes ont été incubées en présence de 10 à 50 µg de tyrosine selon l'activité spécifique de cet acide aminé. Or la teneur en tyrosine du milieu d'incubation semble susceptible de modifier la vitesse d'incorporation de ^{3}H-Tyr dans les protéines thyroïdiennes (Rappaport, 1970).

L'influence de la température d'incubation doit donc être étudiée dans des conditions expérimentales bien précises. Les thyroïdes ou nodules thyroïdiens de plusieurs animaux de taille voisine sont fragmentés, répartis en lots homogènes, puis incubés simultanément pendant un temps donné à différentes températures, en présence d'une quantité déterminée de ^{3}H-Tyr. Dans ces conditions, les résultats obtenus en fonction de la température pour une série d'incubations peuvent être confrontés.

La figure 13 donne un exemple des résultats obtenus pour des lots homogènes de Truite, incubés pendant 6 h à différentes températures. L'incorporation de ^{3}H-Tyr augmente avec la température d'incubation de 5 à 25°C, puis diminue fortement à 30°C. Quel que soit le mode d'expression des résultats en DPM ou % ^{3}H-Tyr incorporés par 100 mg de tissu ou de protéines, le profil des courbes est analogue.

Dans la figure 14 sont comparées les données obtenues pour les quatre espèces de Poissons étudiées. Les séries d'incubation concernant ces diverses espèces étant réalisées en présence de quantités variables de ^{3}H-Tyr selon l'activité spécifique de celle-ci, les résultats sont exprimés en µg de Tyr incorporés par 100 mg de tissu thyroïdien et ne sont sans doute pas comparables quantitativement d'une espèce à une autre.

Chez les Téléostéens, l'accroissement de la température d'incubation de 5 à 20 - 25°C



9 a
9 b
10 a
10 b

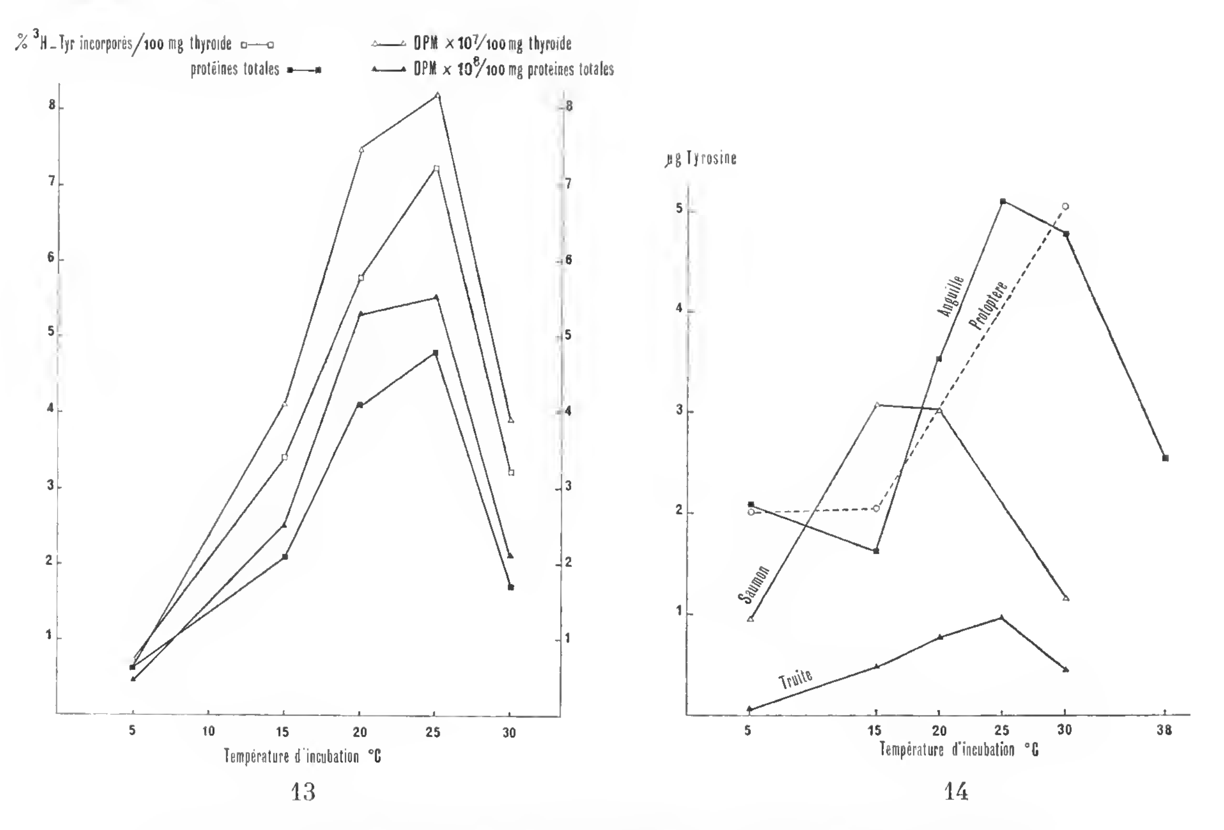


Fig. 13. — *Influence de la température d'incubation sur la synthèse protéique totale dans les nodules thyroïdiens de Truite.*

Fig. 14. — *Influence de la température d'incubation sur la biosynthèse protéique thyroïdienne totale chez diverses espèces de Poissons.*

Les résultats sont exprimés en µg de tyrosine incorporée par 100 mg de tissu thyroïdien et calculée à partir de la ^{3}H-Tyr ajoutée et de son activité spécifique.

Saumon : 0,44 C/mmole, 50 µg tyrosine/ml ; Truite : 6,8 C/mmole, 13 µg tyrosine/ml ; Anguille : 3,2 C/mmole, 12 µg tyrosine/ml ; Protoptère : 24 C/mmole, 7 µg tyrosine/ml.

Fig. 9-12. — 9 et 10 : *Nodules thyroïdiens de Téléostéens après 24 h d'incubation à 20°C dans le milieu de Campagne et Grüber.*

Fixation : Bouin ; coloration : Hémalun-Éosine. Notez que la structure folliculaire est bien conservée. 9a : Truite G × 80 ; 9b : Truite G × 360 ; 10a : Anguille G × 80 ; 10b : Anguille G × 360.

11 : *Nodules thyroïdiens de Truite incubés à 30°C dans le milieu de Campagne et Grüber à différents temps.*

Fixation : Bouin ; coloration : Hémalun-Éosine.

a : Durée d'incubation 6 h ; G × 80. Notez que la structure folliculaire n'est que partiellement conservée. b : Durée d'incubation 24 h ; G × 80. Notez que les cellules thyroïdiennes sont lysées et que les noyaux pycnotiques sont rejetés dans les vésicules colloïdes.

12 : *Nodules thyroïdiens d'Anguille incubés à 38°C dans le milieu de Campagne et Grüber à différents temps.*

Fixation : Bouin ; coloration : Hémalun-Éosine.

a : Durée d'incubation 6 h ; G × 80. Même observation que dans le cas de la figure 11a. b : Durée d'incubation 24 h ; G × 80. Mêmes observations que dans le cas de la figure 11b.

détermine une augmentation de l'incorporation de ^{3}H-Tyr dans la thyroïde. Une nette réduction de cette incorporation est observée à 30°C chez les Salmonidés et à 38°C chez l'Anguille (fig. 14). Une influence analogue de la température d'incubation est constatée lorsque les nodules thyroïdiens de Saumon sont incubés dans le milieu de Cortland.

Dans le cas du Protoptère, la synthèse protéique totale semble beaucoup plus intense à 30°C qu'à 15 et 5°C (fig. 14).

2. Synthèse des protéines solubles

L'accroissement de la température d'incubation exerce une influence comparable sur la synthèse protéique totale et sur celle des protéines solubles, le pourcentage de la radio-

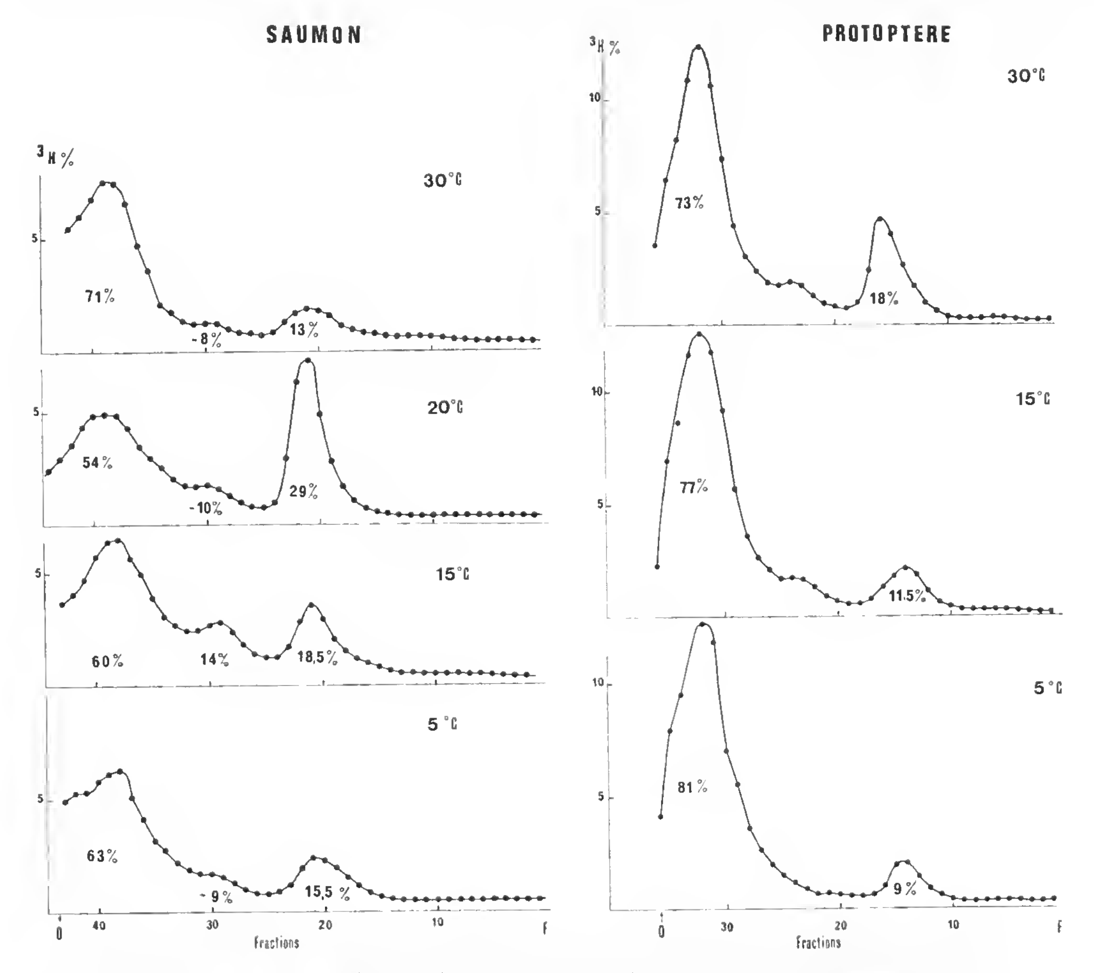


Fig. 15. — *Profils d'ultracentrifugation des protéines solubles néosynthétisées in vitro à différentes températures dans la thyroïde de Saumon et de Protoptère en présence de ^{3}H-Tyr.*
Saumon : centrifugation 3 h 30 à 48 000 tpm ; fractions de 7 gouttes ; Protoptère : centrifugation 2 h 15 à 65 000 tpm ; fractions de 10 gouttes.

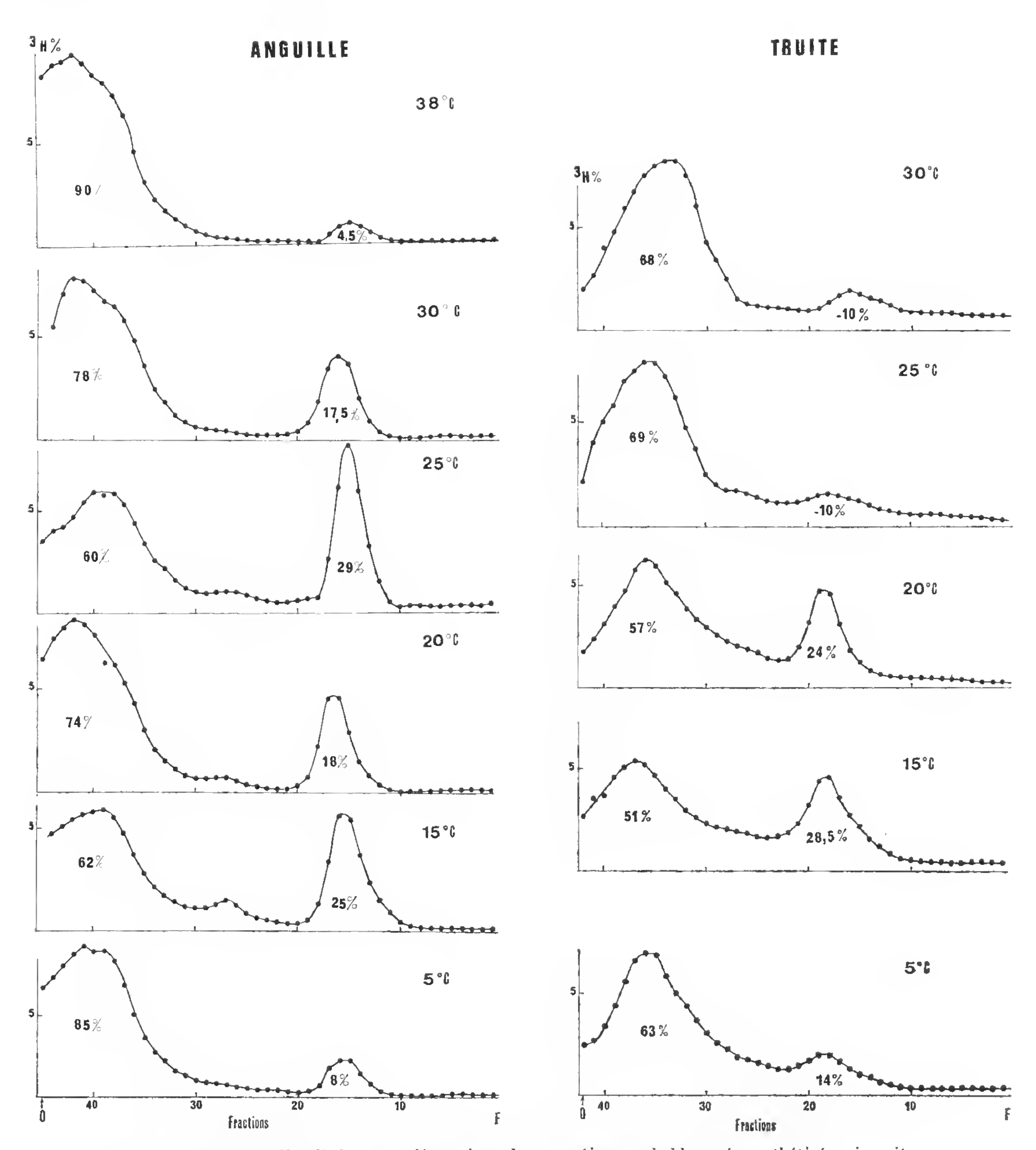


Fig. 16. — *Profils d'ultracentrifugation des protéines solubles néosynthétisées in vitro à différentes températures dans la thyroïde d'Anguille et de Truite en présence de ³H-Tyr.* Activités spécifiques de ³H-Tyr données figure 14. Fractions de 7 gouttes.

activité totale liée à la fraction soluble étant le plus souvent voisin de 52 %. Cependant, il semble que l'incorporation de ^{3}H-Tyr dans les protéines thyroïdiennes solubles chez l'Anguille diminue à 30 et 38°C, la proportion de radioactivité liée à la fraction particulaire étant plus élevée à ces températures.

a — *Analyse des protéines thyroïdiennes solubles*

Les profils d'ultracentrifugation des protéines néosynthétisées in vitro à différentes températures dans la thyroïde des divers Poissons étudiés (fig. 15 et 16) montrent que :

— Dans tous les cas, une proportion non négligeable de thyroglobuline est synthétisée après 6 h d'incubation à 5°C. A cette basse température, on note que le pourcentage de radioactivité qui est localisée dans la zone de la sous-unité est faible et comparable à celui observé à des températures d'incubation supérieures.

— La proportion de préTG néosynthétisée augmente avec la température d'incubation, mais semble atteindre une valeur maximale à des températures différentes selon l'espèce de Poisson considérée. En effet, un pourcentage maximum de préTG est obtenu à 15 - 20°C chez les Salmonidés, à 25°C chez l'Anguille et à 30°C chez le Protoptère. Dans certains cas, à 30°C, chez le Saumon, aucun pic radioactif n'est mis en évidence au niveau de la préTG. Chez l'Anguille, la proportion de préTG décroît de 25 à 38°C, mais est encore importante à 30°C.

Tableau X. — Teneurs en protéines totales solubles et thyroglobuline native soluble de 100 mg de tissu thyroïdien incubé à différentes températures.

Espèces	Températures d'incubation (°C)	Protéines solubles totales (µg/100 mg thyroïde)	TG soluble (µg/100 mg thyroïde)
Saumon	5	7 270	2 500
	15	5 640	2 380
	20	7 054	2 566
	30	7 486	2 600
Truite	5	11 015	5 893
	15	10 770	5 812
	20	9 260	5 494
	25	10 025	6 530
	30	11 170	4 950
Anguille	5	3 400	1 485
	15	4 500	2 188
	20	3 500	1 527
	25	3 200	1 424
	38	3 100	1 544

La diminution du pourcentage de préTG synthétisée à 25-30°C chez les Salmonidés et à 38°C chez l'Anguille peut résulter soit d'un ralentissement de la polymérisation des protéines sous-unitaires en thyroglobuline, soit d'une hydrolyse ou d'une dénaturation rapide de la préTG néoformée. Cependant certaines données ne semblent pas en faveur de cette dernière hypothèse. D'une part, le pourcentage de préTG présent dans un extrait thyroïdien de Saumon, provenant d'une incubation à 15°C, n'est pas modifié par une incubation ultérieure à 30°C pendant 24 h. D'autre part, les teneurs en thyroglobuline native des thyroïdes incubées à 30 ou 38°C chez ces Téléostéens ne sont pas plus faibles que celles des glandes incubées à des températures inférieures (tabl. X).

b — *Synthèse de la thyroglobuline*

L'influence de la température d'incubation sur la synthèse de la thyroglobuline est établie de deux façons (fig. 17) :

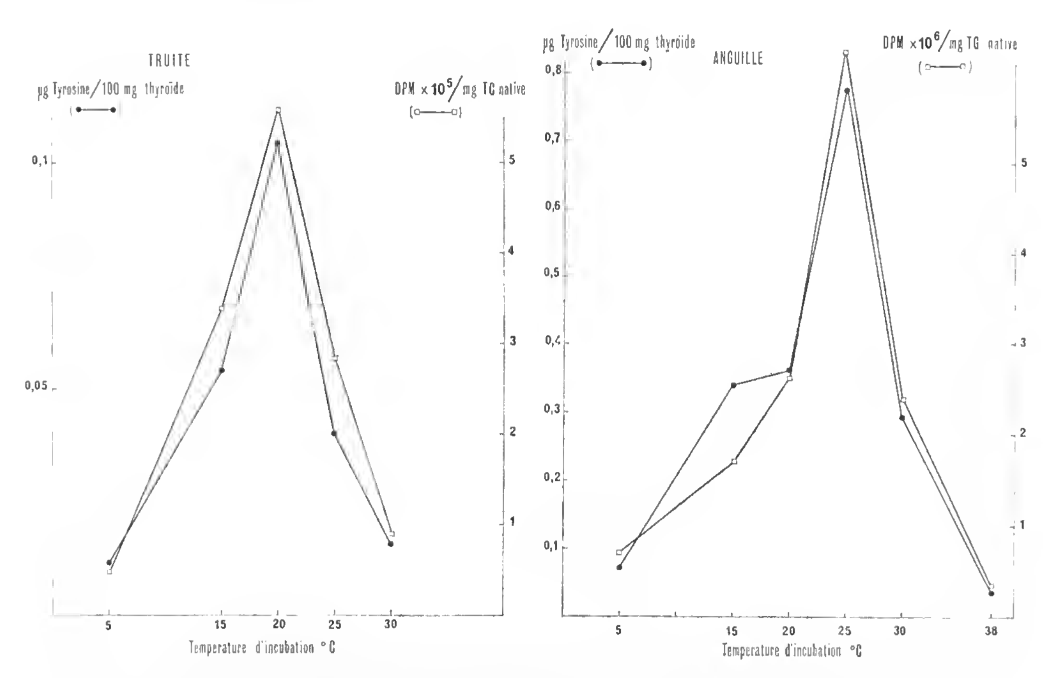


FIG. 17. — *Influence de la température d'incubation sur la synthèse in vitro de thyroglobuline dans la thyroïde de Truite et d'Anguille.*
Activités spécifiques de ^{3}H-Tyr données figure 14.

— Soit en déterminant l'activité spécifique de la thyroglobuline, exprimée en DPM incorporés dans la ^{3}H-préTG par mg de thyroglobuline native. Dans les conditions expérimentales adoptées, les teneurs en thyroglobuline des divers lots de nodules thyroïdiens pour une espèce donnée sont du même ordre de grandeur quelle que soit la température d'incubation (tabl. X).

— Soit en calculant l'incorporation de tyrosine en µg, dans la thyroglobuline néosynthétisée par 100 mg de thyroïde, à partir de l'incorporation de ^{3}H-Tyr dans la fraction soluble et de la proportion de ^{3}H-préTG déterminée par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Les résultats obtenus selon ces deux modes d'expression sont similaires (fig. 17).

La figure 18 montre que chez les divers Poissons étudiés, l'accroissement de la température d'incubation détermine une augmentation de la quantité de thyroglobuline néoformée, jusqu'à une température limite supérieure variable selon l'espèce, puis s'accompagne au-delà d'une diminution de la synthèse de thyroglobuline chez les trois Téléostéens considérés.

La température optimale de biogenèse in vitro de cette protéine chez les Téléostéens est inférieure à la température d'incubation de 38°C utilisée pour les thyroïdes mammaliennes. Elle est de 20°C chez les deux Salmonidés et de 25°C chez l'Anguille.

A la différence de ce qui est observé chez ces trois Téléostéens, la synthèse de préTG est beaucoup plus intense à 30 qu'à 15°C chez le Protoptère. Ceci permet de supposer, bien que des résultats à des températures intermédiaires fassent défaut, que la température optimale de synthèse de la thyroglobuline chez le Protoptère est voisine ou supérieure à 30°C.

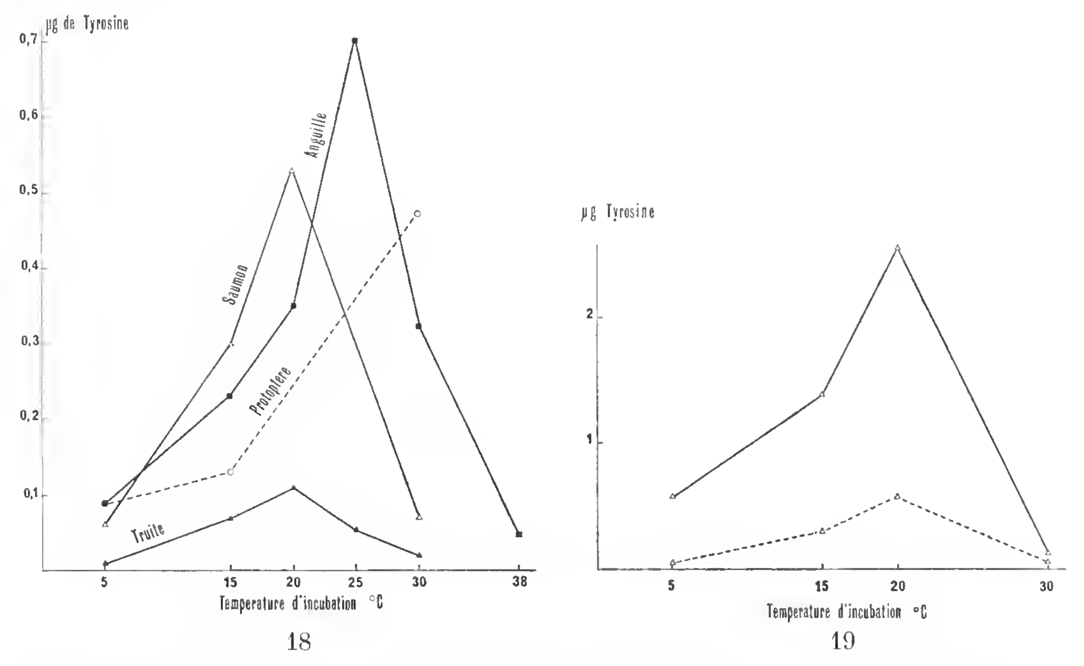


Fig. 18. — *Influence de la température d'incubation sur la synthèse in vitro de la thyroglobuline dans la thyroïde de diverses espèces de Poissons.*
Activités spécifiques de ^{3}H-Tyr données figure 14.

Fig. 19. — *Influence de la température d'incubation sur la synthèse de thyroglobuline dans les nodules thyroïdiens de Saumon.*
Incubations réalisées pendant : ------------------ 6 h ; ——— 24 h.

Les réductions de la biogenèse de préTG à 30°C chez les Salmonidés et à 38°C chez l'Anguille sont comparables (fig. 18).

Les valeurs optimales obtenues pour la synthèse de cette protéine en fonction de la température d'incubation ne résultent pas d'une simple influence de ce facteur sur la cinétique des processus de biosynthèse. En effet, après 24 h comme après 6 h d'incubation, l'intensité de la biosynthèse de préTG dans les nodules thyroïdiens de Saumon est maximale à 20°C (fig. 19). A 5, 15 et 20°C la quantité de préTG formée augmente avec la durée d'incubation, mais demeure pratiquement constante à 30°C, de 6 à 24 h.

3. Température d'incubation et coefficient de sédimentation de la thyroglobuline néosynthétisée

Pour chaque espèce de Poisson étudiée, les coefficients de sédimentation des préTG synthétisées in vitro à des températures inférieures à 30°C chez les Salmonidés et à 38°C chez l'Anguille ne varient pas significativement entre eux, ni avec la durée d'incubation. Ils sont inférieurs de 1 S à ceux des thyroglobulines correspondantes, iodées in vivo et natives (tabl. XI).

TABLEAU XI. — Influence de la température d'incubation sur le coefficient de sédimentation de la ^{3}H-préTG synthétisée in vitro dans les nodules thyroïdiens des Téléostéens.

ESPÈCES	TEMPÉRATURE D'INCUBATION (en °C)	COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION (en S $\pm s_m$)	
		^{3}H préTG	TG native
Saumon	5-15-20	(10) 16,7 ± 0,030	(17) 17,7 ± 0,080
	30	(5) 18,6 ± 0,120	
Truite	5-15-20	(7) 16,8 ± 0,071	(8) 17,7 ± 0,055
	30	(2) 18,5 ± 0,220	
Anguille	5-15-20-25-30	(9) 18,2 ± 0,044	(7) 19,2 ± 0,038
	38	(2) 19,4 ± 0,010	

Les coefficients de sédimentation sont déterminés par ultracentrifugation en gradient de saccharose d'un mélange de thyroglobuline néosynthétisée in vitro marquée par ^{3}H-Tyr et de ^{125}I TG de Bœuf (19 S).
(n), nombre de déterminations ; s_m : erreur standard de la moyenne.

Par contre, lorsque les incubations sont réalisées à 30°C et 38°C respectivement chez les Salmonidés et l'Anguille, les coefficients de sédimentation des protéines néosynthétisées sont nettement plus élevés et atteignent des valeurs supérieures à celles des protéines natives (tabl. XI). Cet accroissement est observé en présence ou non de propylthiouracile et de perchlorate de sodium dans le milieu d'incubation et est donc indépendant des processus d'iodation.

Les vitesses de sédimentation des thyroglobulines marquées in vitro par ^{125}I et natives ne sont pas modifiées après incubation à ces températures élevées.

Ce phénomène a été étudié en particulier chez le Saumon atlantique (Brisson-Martin et Lachiver, 1972*b*) où un accroissement du coefficient de sédimentation est déjà observé au niveau de la sous-unité marquée par la tyrosine tritiée à 30°C.

La constante de sédimentation de la préTG synthétisée à une température déterminée (30 ou 15°C) n'est pas altérée si l'extrait thyroïdien est placé ultérieurement pendant 24 h à une température inférieure (15°C) ou supérieure (30°C).

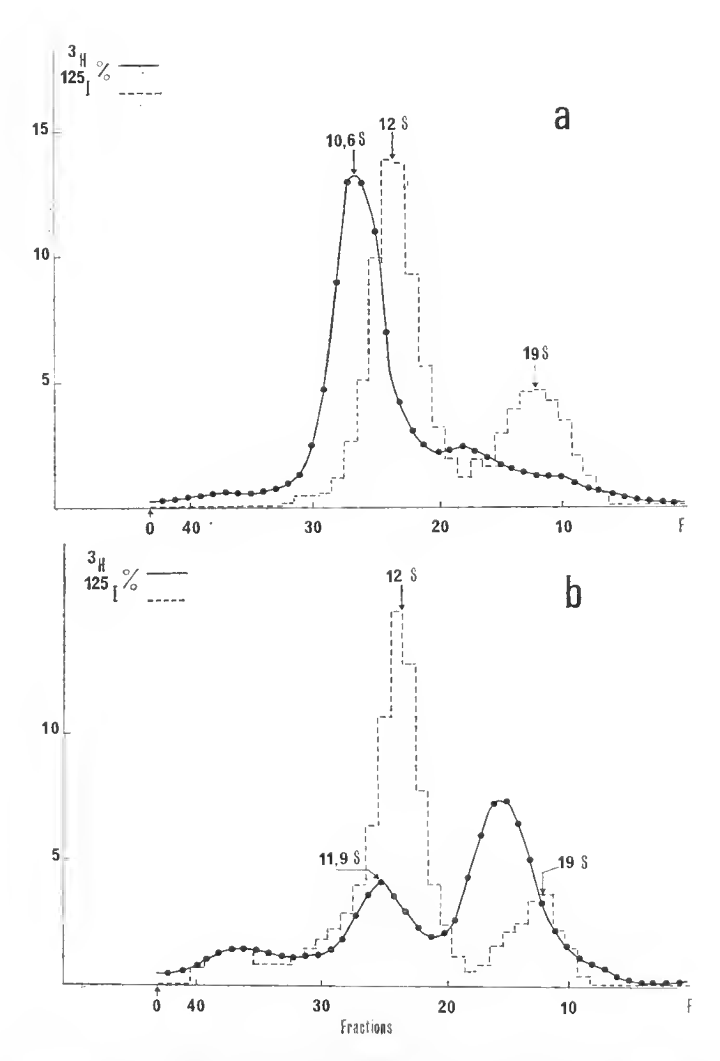


Fig. 20. — *Dissociation par le SDS de la thyroglobuline de Saumon de montée synthétisée in vitro en présence de ³H-Tyr à 15°C (a) et à 30°C (b).*

Les incubations sont réalisées en présence de PTU (1 mM) et de $NaClO_4$ (2 mM). La préTG marquée par ³H-Tyr est purifiée selon le protocole décrit figure 8 b, puis traitée par le SDS et analysée en gradient de saccharose dans les conditions décrites figure 8 c.

Par ailleurs, nous avons étudié l'action du dodécyl sulfate de sodium sur la préTG synthétisée in vitro à différentes températures dans les nodules thyroïdiens du Saumon de printemps (Brisson-Martin et Lachiver, 1972*b*), après isolement et purification de cette protéine selon le protocole précédemment décrit.

Pour les températures d'incubation 5, 15 ou 20°C, 85 % environ de la préTG se dissocient en sous-unités 10,6 S (fig. 20 a). Par contre, la préTG synthétisée à 30°C se montre plus résistante au détergent : 35 % seulement de cette protéine sont dissociés en sous-unités 11,9 S (fig. 20 b).

Discussion

Analyse des protéines synthétisées in vitro dans la thyroïde des Poissons

Les processus de biosynthèse in vitro des protéines thyroïdiennes chez les Poissons étudiés présentent divers points communs avec ceux décrits chez les Mammifères :

— Les thyroïdes incorporent la tyrosine tritiée dans différentes fractions protéiques solubles dont le spectre d'ultracentrifugation en gradient de saccharose est analogue à celui des protéines synthétisées in vivo et in vitro dans la thyroïde des Mammifères. Leurs coefficients de sédimentation sont voisins, par ordre croissant, de 3-8, 12 et 19 S.

— La biosynthèse de ces protéines est indépendante de l'iodation.

— Dans le cas de chacune des espèces étudiées, la protéine tritiée qui migre le plus rapidement présente un coefficient de sédimentation voisin, mais légèrement inférieur (1 S) à celui de la thyroglobuline native, que les incubations soient réalisées en présence ou non d'inhibiteur de l'iodation. Cette protéine qui n'est donc pas ou très peu iodée et qui est précipitée par le sulfate d'ammonium dans les mêmes limites de concentration que la thyroglobuline, correspond vraisemblablement à la préthyroglobuline des Mammifères.

La fraction protéique tritiée $\simeq$ 12 S présente une importance très variable selon les espèces, mais aussi au sein d'une même espèce. Chez l'Anguille, en particulier dans des conditions expérimentales apparemment identiques, la proportion de cette protéine peut varier de 25 à $\simeq$ 0 % (fig. 6 a et 16) sans qu'il soit possible de relier cette variabilité à un facteur expérimental précis.

L'origine de cette fraction protéique a fait l'objet de nombreuses discussions. Représente-t-elle un précurseur de la thyroglobuline ou n'est-elle qu'un produit de dissociation de cette protéine ?

Ce composé $\simeq$ 12 S, marqué par les acides aminés radioactifs, mis en évidence dans les extraits thyroïdiens de certains Mammifères (Seed et Goldberg, 1963, 1965*a* ; Lissitzky *et al.*, 1964, 1965 ; Nunez *et al.*, 1967*a* ; Cavalieri et Searle, 1967*a* ; Ekholm et Strandberg, 1967*a*, *b* ; Thomson et Goldberg, 1968) a généralement été considéré comme le précurseur de la thyroglobuline.

Mais actuellement la seconde hypothèse semble prévaloir (Vecchio *et al.*, 1971), car Schneider *et al.* (1970, 1971) ont montré que la présence du composé 12 S dépend des conditions expérimentales utilisées. En effet, à basse température (2 à 9°C) et force ionique de 0,15, la thyroglobuline *néosynthétisée à 38°C* et la thyroglobuline peu iodée de Cobaye et de Rat, mais non celles de Bœuf, se dissocient en sous-unités 12 S, qui peuvent se réasso-

cier à 23°C en 19 S. Ces résultats suggèrent que la sous-unité n'est pas normalement présente in situ dans la thyroïde des Homéothermes. La mise en évidence de cette protéine serait due à la dissociation de la thyroglobuline néoformée dont la structure est plus labile que celle de la thyroglobuline préformée (SELLIN et GOLDBERG, 1965 ; LISSITZKY *et al.*, 1965*a* ; NUNEZ *et al.*, 1966 ; SIMON *et al.*, 1966 ; INOUE et TAUROG, 1968*b*, *c*).

Les divers degrés de stabilité thermique des préTG selon l'espèce de Mammifères étudiée sont vraisemblablement liés à des variations dans la structure primaire de cette protéine. Il doit en être de même chez les Poïkilothermes dont les thyroglobulines présentent des compositions différentes entre elles et de celles des Mammifères (MARCHELIDON *et al.*, 1972).

Dans le cas des Poïkilothermes et des Mammifères hibernants, dont la température corporelle subit d'amples variations, le problème de la stabilité thermique de la préthyroglobuline en fonction des conditions expérimentales se pose différemment et doit être envisagé en considérant les caractéristiques thermiques de chaque espèce.

En effet, la température expérimentale de 5°C utilisée est physiologique pour les Téléostéens étudiés. Par ailleurs, la mise en évidence d'une proportion non négligeable de préTG *synthétisée à 5°C* dans les thyroïdes de ces Poissons, sans que le pourcentage de la sous-unité augmente, suggère que la thyroglobuline nouvellement synthétisée présente une certaine stabilité à basse température chez les Poissons.

L'accumulation in situ de la sous-unité due à une faible vitesse de polymérisation et l'iodation éventuelle de cette protéine n'est donc pas entièrement exclue chez les Poïkilothermes et chez certains Mammifères hibernants comme le Lérot (LACHIVER et FONTAINE, 1964).

Dans l'hypothèse inverse, la dissociation et la réassociation de la thyroglobuline néoformée ou peu iodée en fonction de la température corporelle pourrait constituer un phénomène naturel dans le domaine des températures physiologiques de chaque espèce animale.

Le matériel migrant dans la zone 3-8 S n'a pas été analysé chez les Poissons, mais est probablement de nature hétérogène comme chez les Mammifères où il contient en plus des précurseurs de la thyroglobuline (ROQUES *et al.*, 1969 ; VECCHIO *et al.*, 1969, 1971 ; CERIANI *et al.*, 1971) d'autres protéines susceptibles d'être synthétisées in vitro dans la thyroïde (OTTEN *et al.*, 1971).

Température d'incubation et biosynthèse de la thyroglobuline

L'étude de l'influence de la température d'incubation sur la synthèse protéique thyroïdienne chez les Poissons met en évidence d'une part un certain nombre de phénomènes communs pour les diverses espèces considérées et d'autre part l'existence de différences interspécifiques dans les zones de températures optimales pour la synthèse de thyroglobuline (BRISSON-MARTIN et LACHIVER 1972*a*).

Chez les divers Poissons étudiés, l'accroissement de la température d'incubation jusqu'à une valeur limite supérieure s'accompagne d'une augmentation de l'incorporation de ^{3}H-Tyr dans la thyroïde et de la quantité de thyroglobuline néosynthétisée. Ces données, bien qu'obtenues in vitro, sont en accord avec l'influence positive de la température in vivo sur le métabolisme iodé thyroïdien des Poissons (voir Introduction). Bien que la synthèse

et l'iodation des protéines thyroïdiennes soient indépendantes l'une de l'autre, il est vraisemblable que ces deux processus sont plus ou moins synchronisés afin d'assurer un fonctionnement thyroïdien harmonieux.

Un effet direct ou indirect de la température d'incubation sur la synthèse protéique thyroïdienne peut être envisagé.

Les travaux de LELOUP et FONTAINE (1960) suggèrent que le relais hypophysaire est mis en jeu dans l'influence de la température in vivo sur le métabolisme iodé thyroïdien, puisque cette dernière disparaît chez l'Anguille hypophysectomisée. L'élévation de la température pourrait entraîner une augmentation du taux de TSH circulant (FONTAINE et FONTAINE, 1957). Cependant dans nos conditions expérimentales in vitro, l'hypothèse d'un effet direct de la température sur la synthèse protéique thyroïdienne est plus vraisemblable.

L'élévation de la température peut jouer à différents niveaux de la synthèse des protéines thyroïdiennes.

NEVILLE (1971) observe que la pénétration in vitro de la cycloleucine dans le muscle de Grenouille est plus rapide à 25 qu'à 0°C. MORRIS et SMITH (1967) constatent que la vitesse d'incorporation in vivo de certains acides aminés dans la muqueuse intestinale du Poisson rouge augmente en fonction de la température d'acclimatation de l'animal. Il est donc probable que l'augmentation de la température d'incubation accélère l'entrée des acides aminés dans les cellules thyroïdiennes, ainsi que les vitesses des diverses réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse des protéines thyroïdiennes.

Une influence positive de l'élévation de la température d'incubation est observée chez les divers Poissons étudiés, mais cette action s'exerce jusqu'à une température limite supérieure qui diffère selon l'espèce considérée.

La mise en évidence in vitro d'un optimum thermique de synthèse de la thyroglobuline peut a priori résulter de conditions expérimentales artefactuelles ou correspondre à certains caractères spécifiques des cellules thyroïdiennes. Envisageons successivement ces possibilités.

— In vitro, l'optimum thermique de certaines fonctions physiologiques varie avec les conditions ioniques du milieu ; la valeur de cet optimum tend à s'élever lorsque le rapport K^+/Na^+ augmente (BACHRACH et GUILLOT, 1941). Alors que les concentrations en Na^+ dans la colloïde de la thyroïde et dans le plasma de Rat sont similaires ($\simeq$ 140 mEq/l), la concentration en K^+ dans la colloïde thyroïdienne ($\simeq$ 10 mEq/l) est deux à trois fois supérieure à celle du plasma (YOUNG *et al.*, 1970). Ces auteurs suggèrent que la forte concentration en K^+ de la thyroïde est en relation avec l'état fonctionnel de la glande. Par ailleurs, un environnement intracellulaire riche en K^+ et pauvre en Na^+ est nécessaire aux étapes initiales de la synthèse protéique (LUBIN, 1964) et à l'entrée des acides aminés et des sucres dans les cellules. Nous savons aussi que l'incubation à 5°C de tissus de Mammifères entraîne un appauvrissement de ceux-ci en K^+, appauvrissement beaucoup plus atténué dans les tissus des Hibernants que dans ceux des Homéothermes (WILLIS, 1972) ; SMITH (1972) suppose qu'il en est de même pour les tissus des Poïkilothermes. Or les milieux de Campagne et Grüber ou de Cortland, qui sont sensiblement isoosmotiques au plasma des Poissons étudiés, présentent respectivement un rapport K^+/Na^+ de 0,1 et 0,06, supérieur à celui du plasma ($\simeq$ 0,03 dans le cas de l'Anguille). Sous cet aspect, les conditions ioniques

des milieux utilisés semblent donc convenables pour la synthèse de thyroglobuline chez les Poissons à toutes les températures étudiées.

— Pour chaque espèce étudiée, une légère variation de cet optimum en fonction de la température à laquelle sont acclimatés les animaux n'est pas exclue. Aussi nous indiquerons que les Saumons furent pêchés dans les gaves dont la température est voisine de 10°C (± 2°C), que les Truites et les Anguilles furent maintenues en eau courante au laboratoire entre 12-15°C et les Protoptères dans de l'eau à 20°C.

— Cependant la zone de température optimale à la biogenèse in vitro de la thyroglobuline semble varier selon l'espèce en fonction des caractéristiques thermiques des Poissons étudiés.

Ainsi une intensité maximale de la synthèse de la thyroglobuline est observée à 20°C chez les deux Salmonidés, Poissons des régions tempérées qui présentent la zone de tolérance thermique la plus basse (Brett, 1956). Leurs températures léthales inférieure et supérieure sont respectivement voisines de 2 et 25°C.

La température optimale de synthèse de la thyroglobuline est de 25°C chez l'Anguille européenne. Or ce Téléostéen est beaucoup plus eurytherme que les Salmonidés et est susceptible de vivre dans des biotopes très variés. Aucune donnée précise sur la zone de tolérance thermique de cet Apode n'a été trouvée dans la littérature, mais nous savons que des Anguilles sont fréquemment pêchées dans des eaux de 25°C et qu'elles ne présentent un bon développement en pisciculture qu'au-dessus de 18°C (Huet, 1970), température quasi maximale utilisée dans les piscicultures de Truite. Par ailleurs, nous avons constaté que des Anguilles, maintenues préalablement à 15°C supportent pendant plusieurs jours une température de 30°C et meurent après 24 ou 48 h à 35°C. La température léthale supérieure de l'Anguille est donc nettement plus élevée que celle des Salmonidés et doit être voisine de 35°C.

Chez le Protoptère, la biosynthèse de la thyroglobuline est beaucoup plus intense à 30°C qu'elle ne l'est à 15°C. Ceci permet de penser que la température optimale de synthèse de cette protéine est voisine de 30°C chez ce Poisson. Or ce Dipneuste, originaire du Tchad, vit dans des eaux calmes dont la température peut atteindre 30°C dans les mares isolées et présente vraisemblablement une température léthale supérieure encore plus élevée que celle de l'Anguille européenne.

Au-delà de ces températures optimales d'incubation la quantité de thyroglobuline néosynthétisée diminue chez les trois Téléostéens étudiés pour être nettement réduite à 30 et 38°C respectivement chez les Salmonidés et l'Anguille.

On peut supposer qu'au-delà d'une certaine température critique, l'élévation de la température exerce une action dénaturante sur les systèmes enzymatiques en entraînant leur inactivation.

Il est probable que certaines étapes de la biosynthèse de la thyroglobuline ne se réalisent pas à des températures d'incubation supraphysiologiques car il est généralement admis qu'une correspondance étroite existe entre les températures léthales supérieures des cellules et celles des organismes entiers dans les différentes classes de Vertébrés (Stephenson, 1966 ; Licht, 1969). Ainsi Wolf et Quimby (1962) constatent que la température limite de survie en culture des gonocytes de Salmonidés est de 26°C. Cette température ne correspond pas cependant à la disparition de tous les processus métaboliques dans les

divers organes : la consommation d'oxygène in vitro du cerveau de *Salmo salar* L. et *Salvelinus fontinalis* Mitch. augmente de 6 à 30°C (Peterson et Anderson, 1969).

Nous constatons que les thyroïdes des Salmonidés et de l'Anguille, incubées pendant 6 h à 30 et 38°C, températures léthales pour ces Téléostéens, ne présentent qu'une structure folliculaire partiellement bien conservée.

Chez les Mammifères, la synthèse de thyroglobuline a été mise en évidence en système acellulaire (Nunez *et al.*, 1967*b* ; Morais et Goldberg, 1967 ; de Nayer et de Visscher, 1969, 1970). Il est intéressant de noter une certaine analogie entre les phénomènes observés dans le système précité (accroissement du coefficient de sédimentation de la protéine synthétisée et résistance accrue au détergent) et les résultats obtenus à 30 et 38°C chez les Téléostéens étudiés, températures auxquelles une désintégration cellulaire partielle est observée. En effet, alors que dans un domaine de températures physiologiques pour ces Poissons, le coefficient de sédimentation de la préTG pour chaque espèce ne varie pas, une augmentation significative du coefficient de sédimentation de cette protéine est constatée à des températures supraphysiologiques. Dans le cas du Saumon, l'accroissement de ce paramètre est déjà mis en évidence au niveau de la sous-unité (Brisson-Martin et Lachiver, 1972*b*), et la préTG synthétisée à 30°C présente aussi une résistance accrue au dodécyl sulfate de sodium. Ceci permet de supposer que les températures d'incubation élevées favorisent la formation de liaisons covalentes entre les sous-unités, mais sont susceptibles de modifier aussi la structure tertiaire des sous-unités et donc la structure quaternaire de la thyroglobuline.

La synthèse in vitro de la thyroglobuline dans les thyroïdes des Téléostéens étudiés est donc optimale à des températures d'incubation très nettement inférieures à celles de 38°C utilisée pour incuber les thyroïdes mammaliennes, lesquelles conservent leur structure spécifique après 24 h à cette température (Nunez *et al.*, 1964).

Les différences d'activité thyroïdienne et de capacité de biosynthèse protéique en fonction de la température entre les thyroïdes des Poissons et des Mammifères apparaissent nettement aussi à de basses températures dans des conditions expérimentales d'incubation identiques.

Alors qu'à 5°C une synthèse de préTG est mise en évidence chez les divers Poissons étudiés, l'incorporation de ^{3}H-Tyr et la formation de thyroglobuline sont pratiquement nulles dans les thyroïdes d'un Homéotherme, le Rat, et d'un Hibernant, le Lérot (*Elyomis quercinus L.*), incubées à 5°C pendant 6, 24 ou 48 h (Lachiver, 1969). Les cellules en incubation conservent cependant leur faculté de synthèse protéique, qui reprend rapidement dès que les coupes sont portées à 38°C et plus lentement à 20°C.

Des différences analogues dans le comportement des thyroïdes des Mammifères et des Poïkilothermes, incubées à basse température, sont observées en étudiant le métabolisme iodé (voir Lachiver, 1969).

L'ensemble des données relatives à l'influence de la température in vitro sur la biosynthèse protéique thyroïdienne, obtenues chez les différents Vertébrés étudiés, est à rapprocher de certains travaux réalisés sur divers Poïkilothermes et Mammifères. Hochachka et Somero (1968), Somero et Hochachka (1968), Johansson (1969), Behrish (1969), Somero (1969, 1972) montrent que la température peut, par divers mécanismes, jouer un rôle important dans la régulation de l'activité enzymatique. Ces ajustements thermiques sont considérés comme adaptatifs si les enzymes présentent une activité maxi-

male pour des températures correspondant à eelles de l'environnement naturel des animaux. Par ailleurs, Licht (1967, 1969) observe un parallélisme entre les différenees interspéeifiques des thermopreferenda de divers Lézards, les différenees des températures optimales d'aetivité des museles et de l'adénosine triphosphatase museulaire et les différenees des températures de dénaturation de eet enzyme.

A la lumière de ees différents résultats, bien que la biosynthèse de la thyroglobuline eonstitue un phénomène global très eomplexe, l'hypothèse d'une eertaine adaptation thermique des proeessus enzymatiques impliqués dans la synthèse de eette protéine, en fonetion de la zone de toléranee thermique de ehaque espèee, peut être envisagée.

III. IODATION IN VIVO DES PROTÉINES THYROÏDIENNES

Dans la thyroïde des Mammifères, la thyroglobuline et l'iode jouent un rôle capital dans la biogenèse hormonale. L'iodation de certains résidus de tyrosine de la thyroglobuline et le couplage de deux iodotyrosines conduit à la formation des hormones thyroïdiennes, qui sont ensuite libérées lors de la protéolyse de la thyroglobuline et sécrétées dans le sang.

Chez les Vertébrés inférieurs, dans la thyroïde desquels les iodothyronines T_4 et T_3 ont été identifiées, l'hormonogenèse s'effectue vraisemblablement selon un schéma similaire, mais à des vitesses plus faibles et très variables selon l'espèce (voir mises au point Berg *et al.*, 1959 ; Leloup et Fontaine, 1960 ; Dodd et Matty, 1964 ; Gorbman, 1969).

Nous avons montré que la thyroïde des Vertébrés inférieurs étudiés contient des protéines thyroglobuliniques, atteignant des taux d'iodation élevés, dont la synthèse est indépendante de l'iodation et probablement antérieure à ce processus comme chez les Mammifères.

Dès 1948, Derrien *et al.* avaient émis l'hypothèse que toutes les molécules de thyroglobuline présentes dans les vésicules colloïdes n'étaient pas uniformément iodées et que la thyroglobuline était constituée par un mélange de fractions d'une même protéine, plus ou moins halogénées.

Une telle hétérogénéité d'iodation a été mise en évidence par chromatographie sur DEAE-cellulose des extraits thyroïdiens mammaliens (Ingbar *et al.*, 1959 ; Roche *et al.*, 1960 ; Ui *et al.*, 1961 ; Robbins, 1961, 1963 ; Shulman et Stanley, 1961 ; Bouchilloux *et al.*, 1964 ; Robbins *et al.*, 1966).

Après équilibrage isotopique de la glande thyroïde de Rat avec ^{125}I, Lissitzky *et al.* (1965), Robbins *et al.* (1966), Rappaport (1970), Gavaret *et al.* (1971) ont mis en évidence d'autres aspects de l'hétérogénéité d'iodation, en observant les modifications de certains caractères physico-chimiques de la thyroglobuline, qui sont concomitantes de l'iodation. En particulier, un accroissement du coefficient de sédimentation et de la stabilité de la structure quaternaire de cette protéine est généralement constaté (Nunez *et al.*, 1966).

Ces résultats suggèrent que la thyroglobuline des Mammifères est constituée de molécules présentant des degrés divers d'iodation. La thyroglobuline analysée étant extraite de l'ensemble des vésicules colloïdes d'une ou de plusieurs glandes, une telle hétérogénéité d'iodation peut se concevoir au niveau de chacun ou des divers follicules thyroïdiens.

Le fait que le métabolisme iodé thyroïdien soit beaucoup plus lent chez les Poissons que chez les Mammifères nous a paru favorable à l'analyse des processus d'halogénation dans la thyroïde.

Les dosages de ^{127}I ont été réalisés afin de mettre directement en évidence l'hétérogénéité d'iodation susceptible d'exister au sein des thyroglobulines fortement iodées des Poissons étudiés.

De plus, par double marquage des animaux par les isotopes radioactifs ^{131}I et ^{125}I à des temps variés, la cinétique d'incorporation de l'iode dans les diverses protéines thyroïdiennes a été étudiée afin d'analyser le renouvellement de l'halogène dans la glande et au sein de ces protéines.

A. — Mise en évidence de l'hétérogénéité d'iodation au sein de la thyroglobuline TG_2 et du polymère TG_4

Une telle hétérogénéité, pour être significative, doit être observée dans une thyroïde unique et ne pas résulter d'un mélange de glandes. Aussi l'extrait thyroïdien de chaque animal appartenant aux diverses espèces étudiées est analysé séparément par ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose. Les protéines et l'iode sont dosés dans chaque fraction du gradient avec une précision de 5 % environ.

Les figures 21 a, b, c, donnent un exemple des résultats obtenus pour les thyroïdes de Saumon, de Roussette et d'Anguille.

Les courbes représentant respectivement les protéines et l'iode ^{127}I présentent un décalage net (d'une fraction environ) au niveau de TG_2 et moins accentué à celui de TG_4.

Le rapport $\frac{^{127}I\ \mu g}{\text{protéines}\ \mu g}$ % ou taux d'iodation (I %) augmente des fractions les plus lentes aux plus rapides où il présente un maximum puis décroît. Ainsi pour la TG_2 de Saumon, dont le taux d'iodation moyen est de 1,1 % dans le cas considéré (fig. 21 a), le degré d'halogénation varie de 0,6 (32 at. ^{127}I/mole) à 1,3 % (68 at. ^{127}I/mole). Pour la TG_2 de Roussette (fig. 21 b), dont le taux d'iodation moyen est de 0,5 %, les teneurs extrêmes en iode sont de 0,3 % et 0,65 %.

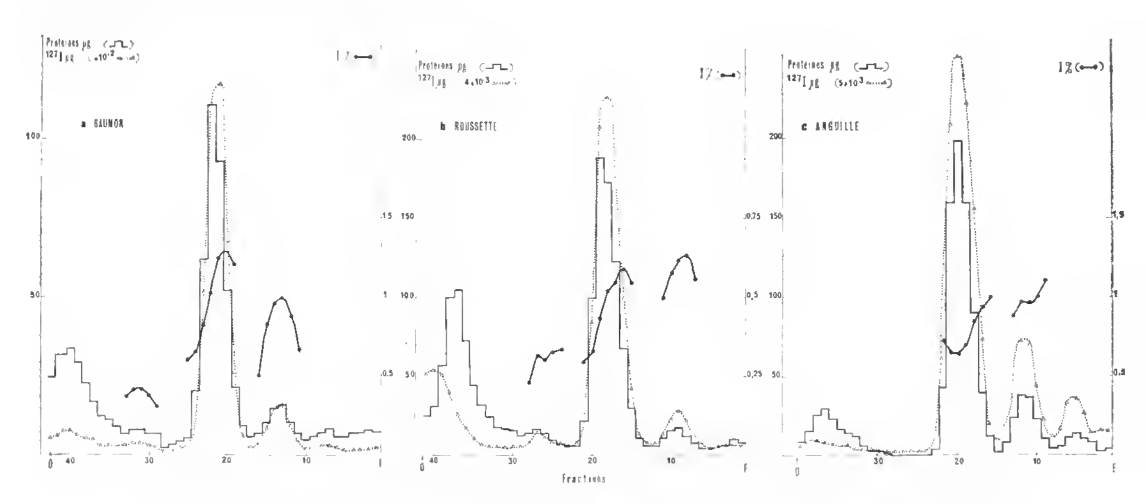


Fig. 21. — *Hétérogénéité d'iodation des protéines thyroïdiennes de divers Poissons.*

L'hétérogénéité d'iodation a été mise en évidence dans la thyroglobuline de toutes les espèces étudiées appartenant aussi bien aux Vertébrés inférieurs (Poissons, Reptiles) qu'aux Mammifères (Bœuf, Rat, Lérot). Elle est observée pour des valeurs moyennes ou élevées du taux d'iodation moyen de la thyroglobuline, mais est moins accusée et parfois presque inexistante dans le cas de glandes très faiblement iodées (I % = 0,1).

En accord avec les données obtenues chez les Mammifères, l'interprétation la plus classique de ce phénomène, et qui sera retenue, paraît être la suivante :

1. La thyroglobuline présente dans la thyroïde des Poissons étudiés est constituée des molécules d'une même protéine, à différents degrés d'iodation. L'hétérogénéité d'iodation serait l'image, à un moment donné, des processus continus d'iodation de la molécule depuis sa biosynthèse jusqu'à son hydrolyse.

2. Cet accroissement dans l'halogénation des molécules détermine des modifications importantes de leurs propriétés (forme ou densité) qui entraînent leur séparation dans le gradient.

Cependant certaines objections peuvent être formulées à l'égard d'une telle interprétation :

a — Les variations apparentes du rapport ^{127}I/protéines dans le pic de TG_2 pourraient être déterminées par la présence de protéines non apparentées à la thyroglobuline et migrant au niveau de celle-ci (immunoglobuline IgM 19 S). Il faudrait alors supposer, hypothèse peu vraisemblable, que ces protéines présentent des variations spécifiques de leur coefficient de sédimentation étroitement parallèles à celles de la thyroglobuline. Par ailleurs, l'hétérogénéité d'iodation est toujours observée après purification de la thyroglobuline par relargage au sulfate d'ammonium selon Derrien *et al.* (1948).

b — La présence, au niveau de certaines fractions de la thyroglobuline, de fragments de celle-ci provenant d'une hydrolyse partielle et donc plus ou moins halogénés, pourrait aussi rendre compte, tout au moins pro parte, des phénomènes observés. Les étapes de la dégradation in vivo de la thyroglobuline sont mal connues. In vitro, son hydrolyse est lente et donne des dérivés de faible poids moléculaire. L'hypothèse d'une réutilisation d'une partie de la molécule de thyroglobuline après hydrolyse a été envisagée (Pitt-Rivers, 1963 ; Wollman, 1969).

c — L'iodation et les modifications éventuelles de la molécule qu'elle entraîne (forme ou densité) est-elle le seul facteur susceptible de rendre compte de la stratification des molécules de TG_2 dans le gradient ?

Il faut remarquer tout d'abord que les fractions les plus lentes qui doivent contenir les molécules de TG_2 néosynthétisée non iodée, ont un taux d'iodation relativement élevé. Il est probable que les phénomènes de diffusion tendent à masquer l'existence d'une hétérogénéité d'iodation plus accentuée que celle mise en évidence. Chaque fraction est elle-même constituée d'un mélange de molécules plus ou moins iodées et le taux d'iodation maximal, que la TG_2 peut atteindre, doit donc être supérieur à la valeur déterminée.

De Crombrugghe *et al.* (1967) constatent que le coefficient de sédimentation de la thyroglobuline humaine croît de 1 S environ pour une augmentation de la teneur en iode de 1 %. Pour les diverses espèces de Poissons étudiées, nous avons aussi observé une telle différence de 1 S entre les coefficients de sédimentation moyens respectivement de la préTG non iodée et de la TG_2 fortement iodée (I % $\geq$ 1). Mais des variations aussi faibles, en fonction du taux d'iodation, des propriétés physico-chimiques de la TG_2, de la densité par exemple, ne devraient pas permettre une séparation des molécules en fonction de ce facteur, telle que nous l'observons.

Il faut noter que les différences de coefficient de sédimentation, que l'on peut calculer

le long du gradient pour les fractions protéiques présentant les degrés d'iodation extrêmes, ne correspondent pas aux variations réelles de ce paramètre en fonction de la teneur en iode. En effet, à différentes augmentations du taux d'iodation de 0,67 % (Saumon, fig. 21 a), de 0,36 % (Roussette, fig. 21 b), de 0,13 % (Rat carencé, fig. 25 c) correspond un même accroissement apparent du coefficient de sédimentation de 4 à 5 S qui résulte essentiellement de la distribution gaussienne des molécules centrifugées en gradient de saccharose.

Aussi, la répartition des molécules dans le pic de thyroglobuline selon leur degré d'iodation reste délicate à interpréter.

Un déplissement partiel, dû à la basse température de centrifugation (SCHNEIDER *et al.*, 1970, 1971) affectant les molécules peu iodées de la thyroglobuline peut être envisagé, ce déplissement ayant pour conséquence de réduire le coefficient de sédimentation de ces molécules et de permettre ainsi leur séparation des molécules plus halogénées.

Afin de tester la validité de cette hypothèse, des extraits thyroïdiens de Rat et de Truite ont été conservés, puis analysés à 5°C ou 23°C. A ces deux températures expérimentales, les courbes d'iodation dans la thyroglobuline restent très similaires (fig. 22 a, b, c, d). Cette hypothèse ne se vérifie donc pas.

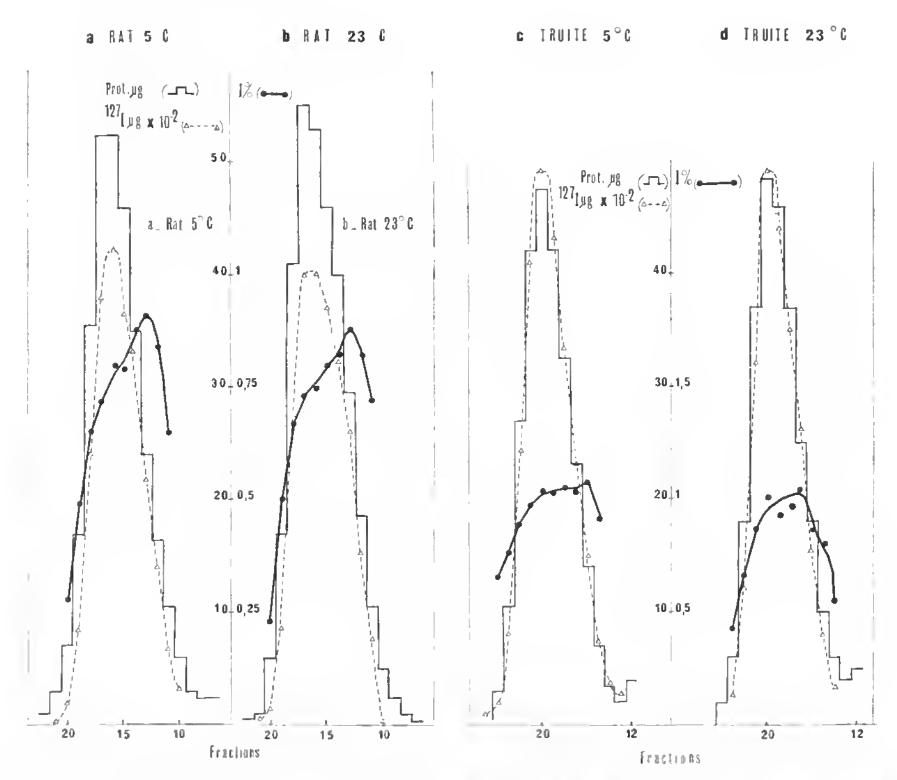


FIG. 22. — *Hétérogénéité d'iodation de la thyroglobuline et température de centrifugation.*
Les extraits thyroïdiens de Rat (régime standard) et de Truite sont ultracentrifugés en gradient de saccharose à 65 000 tpm pendant 2 h 15 à 5°C et pendant 1 h 45 à 23°C. Seules les fractions correspondant à la thyroglobuline sont représentées sur les graphiques.

Il est vraisemblable qu'à l'hétérogénéité d'iodation observée se superpose et s'ajoute un autre type d'hétérogénéité des molécules de thyroglobuline qui contribue à déterminer une telle répartition des molécules dans le pic de thyroglobuline en fonction de leur teneur en iode. Les modifications induites dans la thyroglobuline lors de l'addition séquentielle des motifs glucidiques sont mal connues, mais cette dernière est susceptible de jouer un rôle important dans l'élaboration de la structure de la thyroglobuline (Tarutani, 1971).

B. — Hétérogénéité du renouvellement de l'iode dans les iodoprotéines thyroïdiennes

A l'aide des isotopes radioactifs de l'iode, un aspect complémentaire de l'hétérogénéité d'iodation à l'égard du renouvellement de l'iode est mis en évidence d'une part entre les protéines thyroïdiennes de poids moléculaire différent et d'autre part au sein de la thyroglobuline TG_2 et du polymère TG_4.

1. Cinétique d'incorporation de l'iode radioactif dans les différentes protéines thyroïdiennes

Des expériences de simple et de double marquage ont été réalisées sur plusieurs animaux de chacune des espèces considérées afin d'étudier la cinétique d'incorporation de l'iode radioactif dans les iodoprotéines thyroïdiennes des Poissons. Ces protéines sont analysées par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Un exemple des résultats obtenus par double marquage in vivo est donné pour le Saumon, le Protoptère et l'Anguille (fig. 23) injectés par ^{131}I et ^{125}I respectivement quelques heures et plusieurs jours avant le sacrifice.

La répartition de l'iode radioactif incorporé dans les diverses iodoprotéines est exprimée en pour cent de la radioactivité totale de chaque extrait thyroïdien soluble dialysé. Elle varie sensiblement en fonction du temps de marquage (Lachiver *et al.*, 1966).

Chez le Saumon, le pourcentage de radioactivité liée à la protéine TG_1, qui est de 14 %, 3 h après l'injection de ^{131}I, est réduit à 4 % 8 jours après l'injection de ^{125}I. Simultanément la proportion de TG_2 augmente peu, tandis que celle du polymère TG_4 passe de 12 à 20 %.

Dans les cas du Protoptère et de l'Anguille où la protéine TG_1 est quasi inexistante, le pourcentage de TG_2 diminue légèrement de quelques heures à plusieurs jours après l'injection des isotopes radioactifs. Inversement, les proportions du ou des polymères TG_4 et TG_6 croissent nettement pendant ce temps.

La fixation et l'organification de l'iode radioactif par la thyroïde des Poissons augmentent lentement en fonction du temps (tabl. XII). Il en résulte que les RAS globales de la glande et de l'extrait thyroïdien soluble croissent progressivement de quelques heures à plusieurs jours après l'injection (tabl. XII).

Cependant la RAS globale de chacune des diverses protéines thyroïdiennes TG_1, TG_2, TG_4, exprimée en % de la dose injectée/µg de ^{127}I évolue différemment en fonction du temps de marquage (tabl. XII).

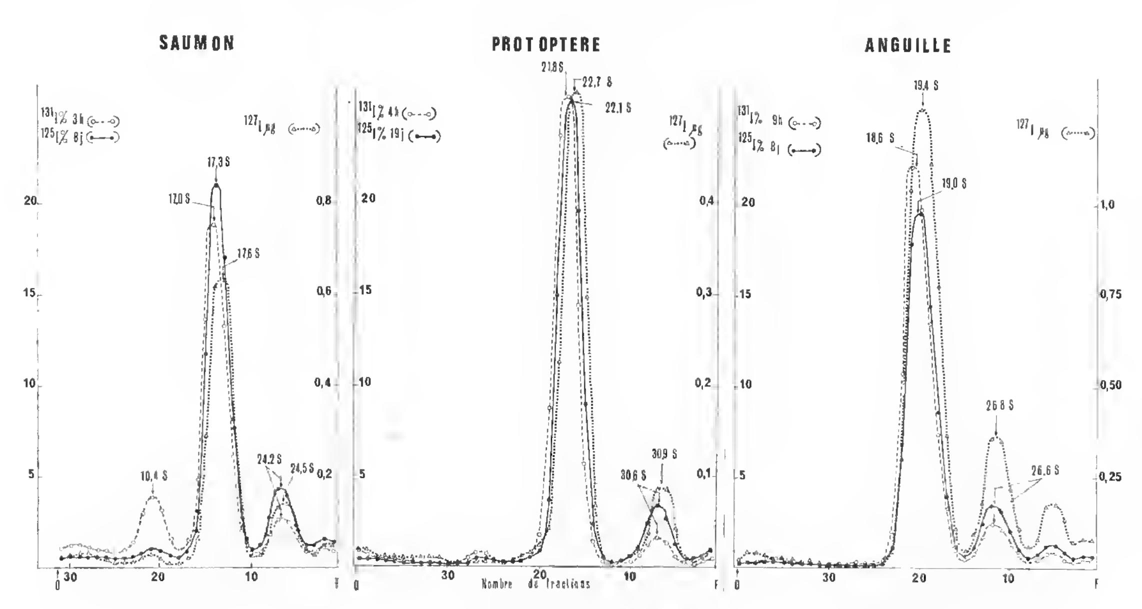


Fig. 23. — *Évolution en fonction du temps de marquage des proportions relatives et des coefficients de sédimentation des différentes iodoprotéines thyroïdiennes chez divers Poissons.*

Tableau XII. — Évolution en fonction du temps de marquage des radioactivités spécifiques globales des protéines thyroïdiennes solubles séparées par ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Espèces	Temps de marquage		Fixation en % dose	RAS globales en % dose × $10^{-3}/\mu g$ ^{127}I		
				TG_1	TG_2	TG_4
Saumon	3 h	^{131}I	0,06	4,8	1,1	0,7
	8 j	^{125}I	2,10	41	30	29
Protoptère	4 h	^{131}I	0,56		17	8
	19 j	^{125}I	24,40		740	730
Anguille	9 h	^{131}I	0,54		34	14
	8 j	^{125}I	4,83		390	255

Dans le cas du Saumon, 3 h après l'injection de ^{131}I la RAS de la protéine TG_1 est nettement supérieure à celles de TG_2 et de TG_4. Huit jours après l'injection, elle est encore la plus élevée, mais les RAS de TG_2 et TG_4 ont respectivement augmenté trois et quatre fois plus que celle de TG_1.

Pour le Protoptère et l'Anguille, on observe que la RAS du polymère TG_4 est nettement

inférieure à celle de la thyroglobuline TG_2 dans les premières heures après l'injection, mais qu'elle augmente beaucoup plus en fonction du temps de marquage que celle de TG_2.

Ces divers résultats suggèrent que la vitesse d'incorporation de l'iode décroît des protéines thyroïdiennes les plus légères aux protéines de poids moléculaire plus élevé.

2. Hétérogénéité du renouvellement de l'iode au sein de la thyroglobuline TG_2 et du polymère TG_4

a — *Coefficient de sédimentation et âge des molécules*

La figure 23 montre que pour chaque espèce le coefficient de sédimentation moyen des molécules de thyroglobuline augmente sensiblement en fonction du temps de marquage. Chez les diverses espèces étudiées, l'accroissement du coefficient de sédimentation de la préTG non iodée, marquée par les acides aminés radioactifs, à la thyroglobuline native iodée, est généralement égal à une unité Svedberg.

Dans le cas du polymère TG_4, la constante de sédimentation des molécules natives est légèrement supérieure à celle des molécules marquées par ^{131}I ou ^{125}I.

b — *Évolution de la RAS dans les iodoprotéines* TG_2 *et* TG_4 *en fonction du temps de marquage*

Les résultats obtenus pour les divers Poissons étudiés étant qualitativement analogues, les cas d'un Saumon et d'un Protoptère doublement marqués seront pris comme exemples. Ils reçoivent respectivement 1 000 et 225 µC de ^{125}I, 8 et 19 jours avant le sacrifice ainsi que 1 800 et 500 µC de ^{131}I, 3 et 4 h avant le sacrifice.

A titre de comparaison, une expérimentation a été réalisée sur des Rats carencés en iode, dont on sait que l'activité thyroïdienne est très intense. On injecte à chacun d'eux 10 µC de ^{125}I intrapéritonéalement et 100 µC de ^{131}I dans la veine jugulaire, respectivement 24 h et 5 mn ou 2 h avant le sacrifice.

Au niveau de chaque fraction de TG_2 et de TG_4, les RAS et les fixations des deux isotopes radioactifs injectés sont calculées respectivement en % de la dose injectée par µg de ^{127}I et par µg de protéines (fig. 24 et 25).

L'examen de ces figures montre que dans les premiers temps après l'injection, c'est-à-dire après quelques heures pour les Poissons (fig. 24) et après 5 mn pour les Rats carencés (fig. 25), la RAS et la fixation de ^{131}I par µg de protéines sont maximales au niveau des molécules de TG_2 et TG_4 de plus faible vitesse de sédimentation et de moindre teneur en iode. Elles diminuent très nettement comme le taux d'iodation des molécules augmente et deviennent minimales au niveau des fractions les plus rapides et les plus iodées.

La confrontation des profils des courbes de RAS et de fixation montre que ce sont les fractions protéiques les plus lentes qui présentent la RAS maximale, non seulement parce qu'elles sont les moins riches en ^{127}I mais aussi parce qu'elles fixent le plus intensément l'iode par µg de protéines.

A des temps plus longs après l'injection, la RAS et l'incorporation de l'iode dans les différentes fractions protéiques constituant la thyroglobuline évoluent très différemment en fonction du temps de marquage chez les Poissons et les Rats carencés.

Dans le cas des Poissons, plusieurs jours après l'injection de ^{125}I, la RAS ainsi que la

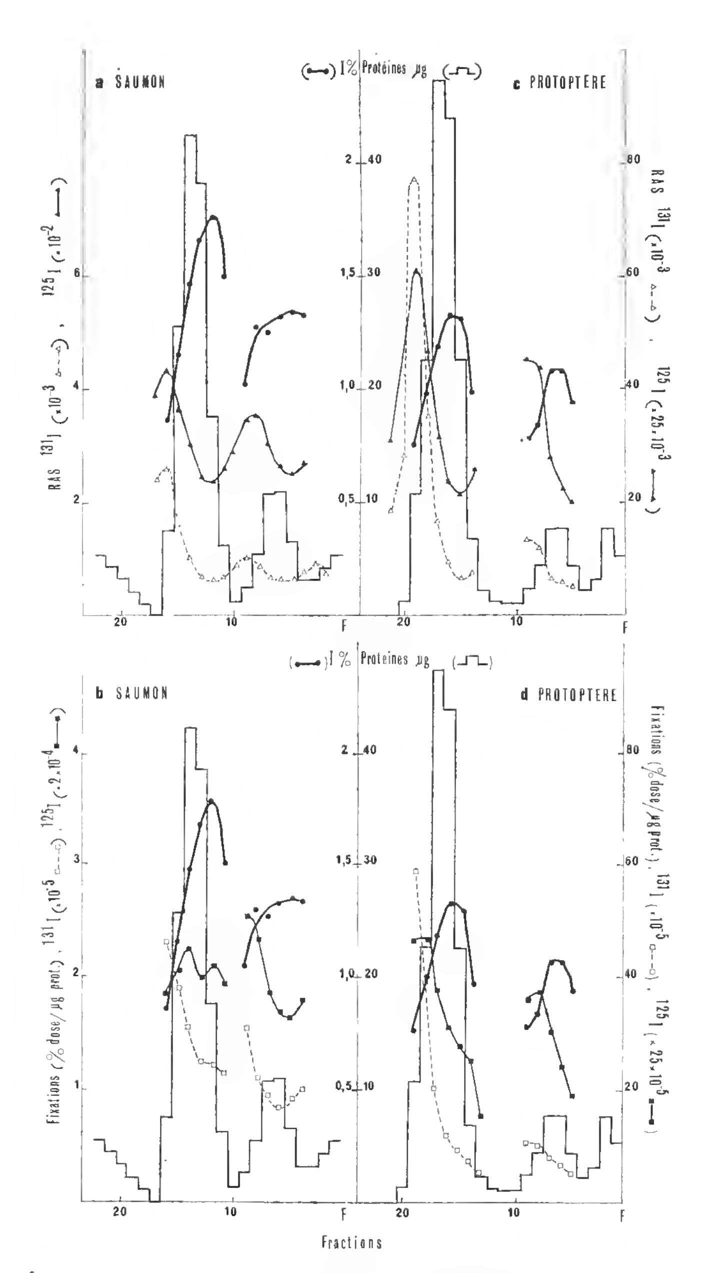


Fig. 24. — *Évolution de la RAS et de la fixation de l'iode en fonction du temps de marquage par l'iode radioactif dans la thyroglobuline TG_2 et le polymère TG_4 chez le Saumon et le Protoptère.*

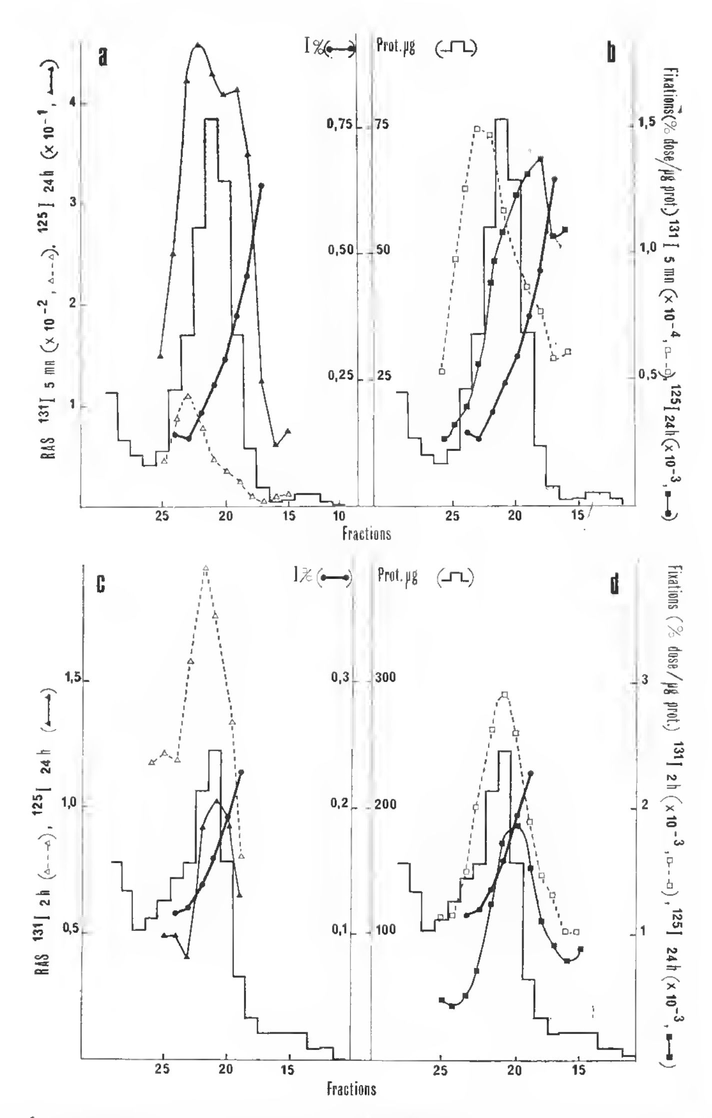


FIG. 25. — *Évolution de la RAS et de la fixation de l'iode en fonction du temps de marquage par l'iode radioactif dans la thyroglobuline de Rat carencé en iode.*

fixation ont augmenté au niveau de toutes les fractions protéiques, mais sont encore maximales pour les molécules les moins iodées et les plus lentes, tant dans TG_2 que dans TG_4. Cependant, l'accroissement de ces paramètres est 2 à 3 fois plus important pour les fractions rapides de taux d'iodation élevé que pour les fractions lentes peu iodées (fig. 24 a, b, c, d).

Au contraire, chez les Rats carencés, les valeurs maximales de RAS (fig. 25 a, c) et de fixation (fig. 25 b, d) tendent à être transférées des molécules lentes aux molécules

les plus rapides et plus halogénées en fonction du temps de marquage. On observe aussi, 24 h après l'injection de ^{125}I, que la RAS des diverses molécules de TG_2 est plus homogène et est égale à la moitié de celle de ^{131}I injecté 2 h avant le sacrifice.

Par ailleurs, nous avons constaté que le coefficient de sédimentation de la TG_2 de ces Rats carencés croît rapidement en fonction du temps de marquage et présente dès 24 h après l'injection un coefficient de sédimentation égal ou supérieur à celui de la thyroglobuline native.

L'évolution très différente en fonction du temps du profil des courbes de RAS et de fixation dans la thyroglobuline des Poissons et des Rats carencés résulte probablement de différences profondes dans les vitesses du métabolisme iodé thyroïdien et du renouvellement de la TG_2.

En effet, chez les Poissons, la fixation de l'iode radioactif par la glande croît lentement en fonction du temps. La RAS de l'iodure intrathyroïdien croît jusqu'à être en équilibre avec celle de l'iodure plasmatique et demeure sensiblement constante pendant le temps de l'expérimentation. Chez le Saumon, elle est égale à 0,038 et 0,047 respectivement 3 h et 8 jours après l'injection. Chez le Protoptère, elle passe de 1,21 à 1,04 de 4 h à 19 jours.

En revanche, chez les Rats carencés, la fixation de l'iode radioactif par la thyroïde est très intense ; elle atteint un maximum 1 ou 2 h après l'injection, puis diminue rapidement. Il en résulte que 24 h après l'injection, les molécules néosynthétisées non iodées fixent un iodure thyroïdien dont la RAS a décru de moitié par rapport au temps 2 h. Cependant un recyclage rapide de l'iodure radioactif dans la thyroïde peut tendre à donner une RAS plus homogène à l'ensemble des molécules de TG_2.

En outre, la TG_2 des Rats carencés présentant une teneur en iode très faible comparativement à celle des Poissons, les molécules néosynthétisées peuvent atteindre beaucoup plus vite le taux d'iodation moyen ou maximal de la TG_2. Elles peuvent donc être rapidement transférées vers les fractions protéiques les plus riches en iode, ce qui se traduit par l'augmentation rapide du coefficient de sédimentation de la TG_2 en fonction du temps de marquage.

C. — Hétérogénéité d'iodation et stabilité de la structure quaternaire de la thyroglobuline TG_2

1. Dissociation par le dodécyl sulfate de sodium des iodoprotéines thyroïdiennes

Les extraits thyroïdiens sont traités par le détergent dodécyl sulfate de sodium (SDS) pendant 1 h à 20°C dans des conditions telles que la dissociation soit quasi maximale (voir Techniques).

Les figures 26 a, b, c, d représentent les profils d'ultracentrifugation des extraits thyroïdiens d'un Saumon et d'un Protoptère avant et après traitement par le SDS.

L'addition de ce détergent provoque une dissociation partielle de la thyroglobuline en sous-unités, mais également une dissociation importante des polymères de la thyroglobuline.

Dans le cas du Protoptère, la proportion de matériel 3-8 S augmente nettement et une fraction non négligeable de ^{127}I se trouve à ce niveau après addition de SDS. Certaines molécules se dissocient donc en composés, de poids moléculaire inférieur à celui de la sous-unité $\simeq$ 12 S.

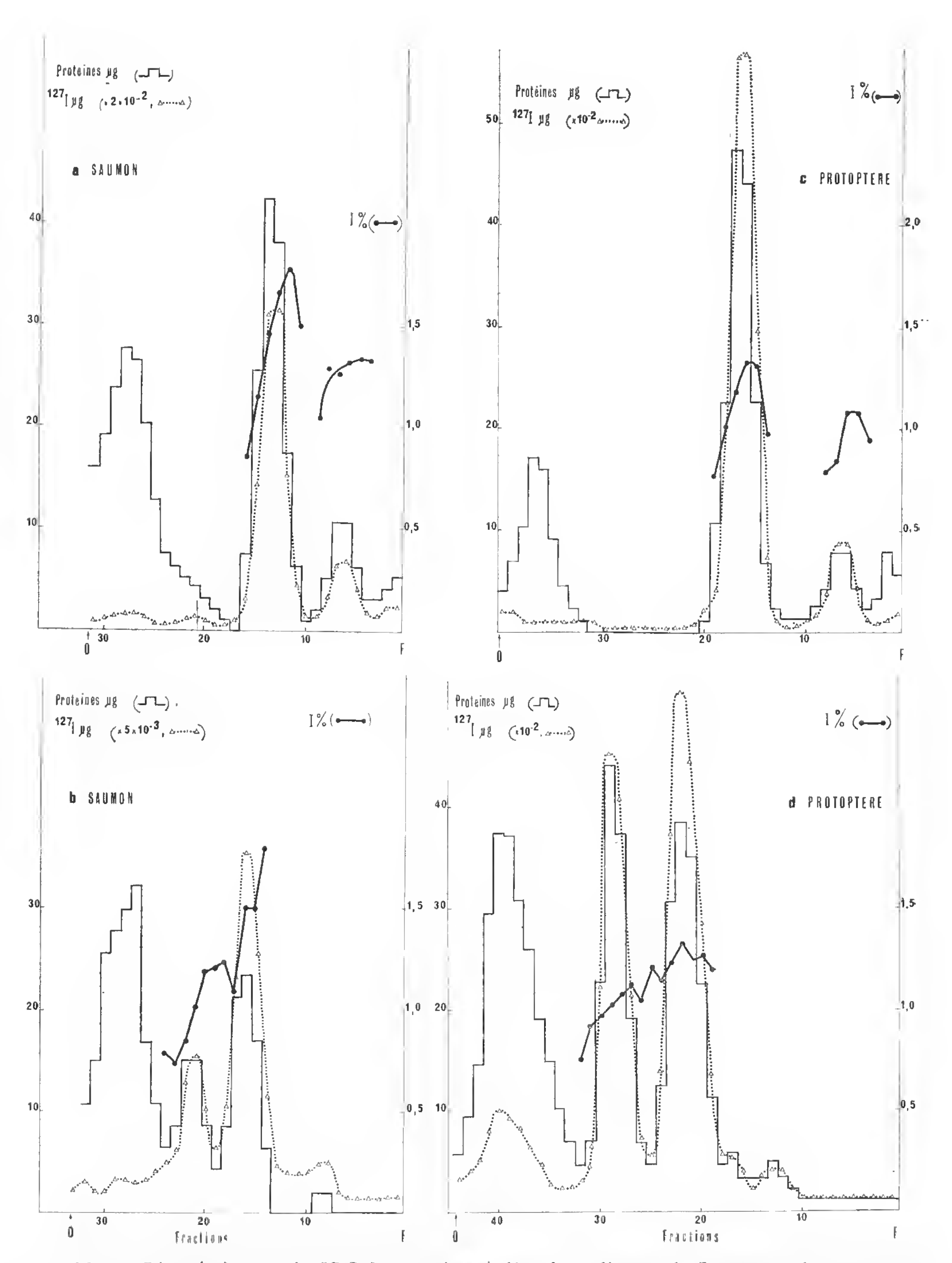


Fig. 26. — *Dissociation par le SDS des protéines iodées thyroïdiennes de Saumon et de Protoptère.*
Les extraits thyroïdiens solubles d'un Saumon et d'un Protoptère sont analysés en gradient de saccharose avant (a, c) et après (b, d) traitement par le SDS (concentration finale de 1,5 × 10^{-3} M ; 1 h à 20°C). Centrifugation 3 h 45 à 48 000 tpm ; fractions de 10 gouttes (a, b) ; centrifugation 7 h à 41 000 tpm, fractions de 20 gouttes (c, d).

Dans tous les cas étudiés, les molécules résistantes au SDS présentent une teneur moyenne en ^{127}I supérieure à celle des molécules dissociées (tabl. XIII). On constate également, qu'après traitement par le SDS, une forte hétérogénéité d'iodation est mise en évidence, principalement au niveau de la sous-unité $\simeq$ 12 S obtenue par dissociation. En effet, dans cette fraction protéique dissociée, le taux d'iodation, qui présente la valeur minimale au niveau des molécules lentes de TG_1, augmente progressivement vers les molécules plus rapides (fig. 26 b, d).

Tableau XIII. — Taux d'iodation moyen des molécules de thyroglobuline avant et après dissociation par le dodécyl sulfate de sodium.

Espèces	Taux d'iodation moyen (en % de TG_2)		
	Avant SDS	Après SDS	
		Fraction dissociée	Fraction résistante
Saumon	1,46	0,96	1,59
Protoptère	1,18	1,03	1,25
Anguille	0,71	0,65	0,80

2. Dissociation et âge des molécules

Les figures 27 a et b montrent que plus les molécules sont marquées pendant des temps courts, plus elles se dissocient en sous-unités. Ce phénomène déjà observé chez les Mammifères a été constaté chez les diverses espèces de Vertébrés inférieurs étudiés.

Dans le tableau XIV sont indiqués les taux de dissociation et les coefficients de sédimentation respectifs des molécules marquées par ^{131}I et ^{125}I, et des molécules natives identifiées par les dosages de protéines et de ^{127}I. La TG_2 marquée pendant quelques heures par ^{131}I, qui présente la plus faible vitesse de sédimentation moyenne, est beaucoup plus dissociable que la TG_2 native ou marquée par ^{125}I plusieurs jours avant le sacrifice des Poissons.

De plus, la comparaison des résultats obtenus pour les Saumons à deux étapes de leur cycle vital (fig. 28) montre que la thyroglobuline des Saumons de frayères après un même temps de marquage présente une structure nettement plus labile que celle des Saumons de montée.

Un cas extrême est représenté par les Saumons de frayères pêchés pendant l'hiver 1968-1969, dont la TG_2 et les polymères, tant natifs que marqués à différents temps, se sont dissociés intégralement en présence de SDS, en un composé migrant dans la zone 3-8 S (fig. 29 a, b). Les taux d'iodation moyens de ces diverses iodoprotéines n'étaient cependant pas significativement différents de ceux des protéines des autres Saumons de frayères (tabl. VIII).

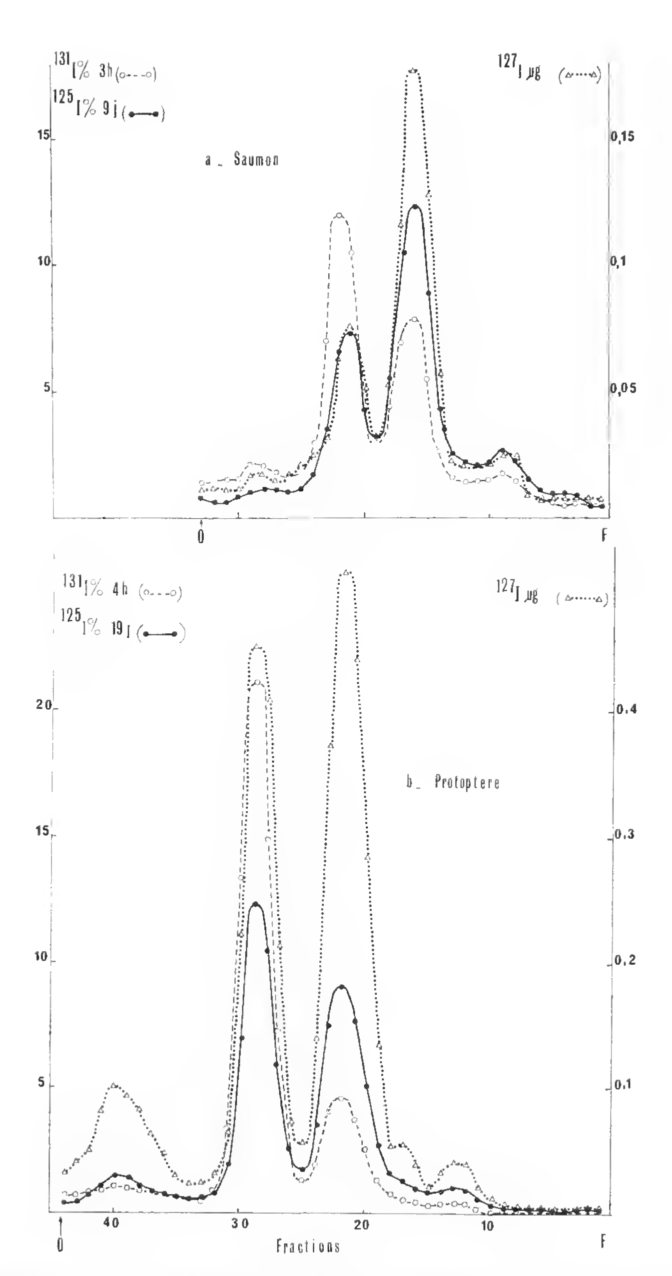


FIG. 27.— *Dissociation par le SDS des protéines iodées de Saumon et de Protoptère en fonction du temps de marquage.*

Centrifugation 3 h 45 à 48 000 tpm, fractions de 10 gouttes (a) ; centrifugation 7 h à 41 000 tpm, fractions de 20 gouttes (b).

TABLEAU XIV. — Coefficients de sédimentation et dissociation des molécules de thyroglobuline en fonction du temps de marquage.

ESPÈCES	MOLÉCULES	^{131}I	TG_2	^{125}I	TG_2	TG_2 native	^{127}I TG_2
		3 h		8 j			
Saumon	S		17,0		17,3	17,4	17,6
	Dissociation en %		49		25	24	21
		4 h		19 j			
Protoptère	S		21,8		22,1	22,3	22,7
	Dissociation en %		74		47	39	34
		9 h		8 j			
Anguille	S		18,6		19,0	19,2	19,4
	Dissociation en %		59		33	26	17

Les extraits thyroïdiens solubles sont analysés par ultracentrifugation en gradient de saccharose avant et après traitement par le SDS.

La dissociation des molécules marquées et natives de thyroglobuline est évaluée par le rapport :

$$\frac{\text{variation du pourcentage } TG_2 \text{ avant et après SDS}}{\text{pourcentage } TG_2 \text{ avant SDS}}.$$

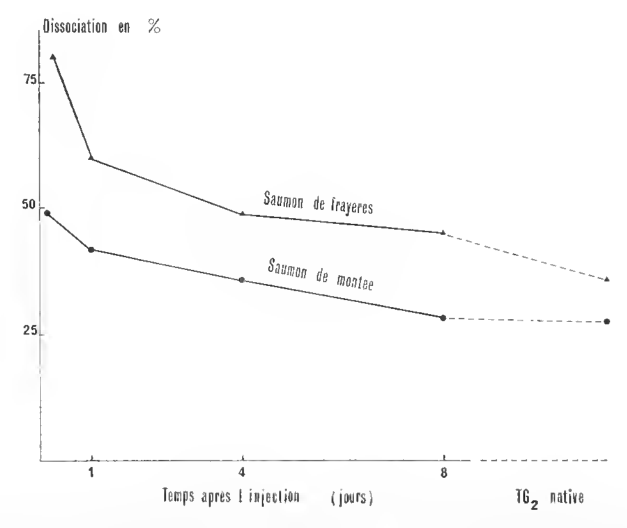


FIG. 28. — *Dissociation par le SDS de la thyroglobuline marquée in vivo à différents temps par l'iode radioactif et de la thyroglobuline native chez les Saumons de montée et de frayères.*
La dissociation est évaluée par le rapport : Variation du pourcentage de TG_2 avant et après SDS/pourcentage initial de TG_2.

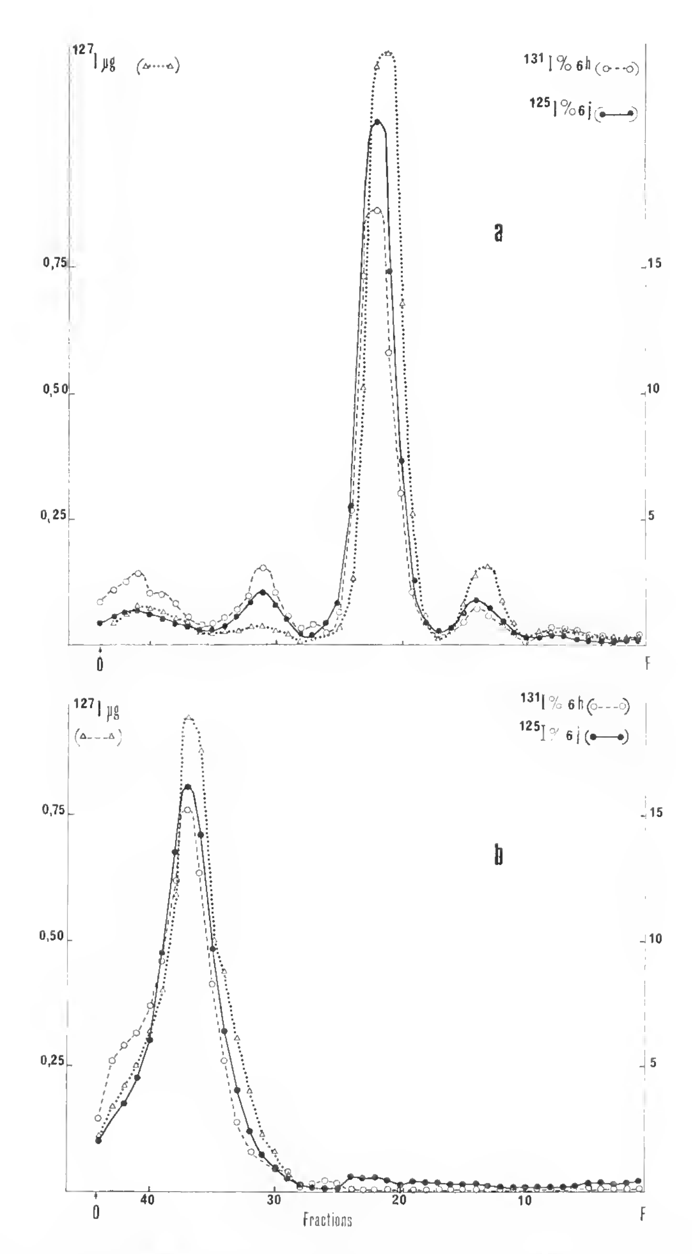


Fig. 29. — *Profil d'ultracentrifugation des protéines thyroïdiennes marquées in vivo par l'iode radioactif et natives d'un Saumon de frayères pêché en hiver 1968-1969.* Conditions d'ultracentrifugation comme indiquées figure 27 b. Avant traitement par le SDS (a) ; après dissociation par le SDS (b).

Par ailleurs, on constate pour le Protoptère (fig. 27 b) que les molécules natives (^{127}I TG_2) se dissocient partiellement en 3-8 S et dans une proportion supérieure à celle des molécules marquées par ^{131}I et ^{125}I.

3. Radioactivités spécifiques des iodoprotéines après traitement des extraits thyroïdiens par le SDS

Dans le tableau XV sont indiquées les RAS moyennes des fractions dissociée et non dissociée de la thyroglobuline en fonction du temps de marquage.

Dans tous les cas, la fraction résistante au détergent, qui correspond aux molécules les plus riches en ^{127}I (tabl. XIII), présente quelques heures après l'injection de ^{131}I une RAS plus faible, de quatre fois environ, que celle de la fraction dissociée (tabl. XV), et du même ordre de grandeur que celle du polymère TG_4 (tabl. XII). Plusieurs jours après l'injection de ^{125}I, la RAS de la fraction résistante tend à devenir égale à celle de la fraction dissociée (tabl. XV).

Tableau XV. — Évolution en fonction du temps de marquage des radioactivités spécifiques de la fraction dissociée et de la fraction résistante de la thyroglobuline après addition de dodécyl sulfate de sodium aux extraits thyroïdiens.

Espèces	Temps de marquage		RAS en % dose × 10^{-3} par µg ^{127}I		RAS $\frac{\text{fraction dissociée}}{\text{fraction résistante}}$
			fraction dissociée	fraction résistante	
Saumon	3 h	^{131}I	2,8	0,9	3,1
	8 j	^{125}I	45	32	1,4
Protoptère	4 h	^{131}I	32	7,3	4,3
	19 j	^{125}I	981	676	1,4
Anguille	9 h	^{131}I	64	17	3,7
	8 j	^{125}I	520	333	1,5

Par ailleurs, la RAS varie considérablement au sein de la fraction dissociée (fig. 30 a, c). Ceci met en évidence l'hétérogénéité du renouvellement de l'iode dans les diverses molécules de la fraction dissociable de la thyroglobuline.

L'examen des courbes de RAS (fig. 30 a, c) et de fixation de l'iode par µg de protéine (fig. 30 b, d) en fonction du temps de marquage montre que les phénomènes étudiés sont très complexes. En effet, après addition de SDS, deux pics s'individualisent ; l'un, A, se situe au niveau des fractions lentes et moins iodées de la sous-unité, et l'autre, B, au niveau des fractions rapides et plus iodées de cette sous-unité ou occupe parfois une position intermédiaire entre la thyroglobuline et la sous-unité.

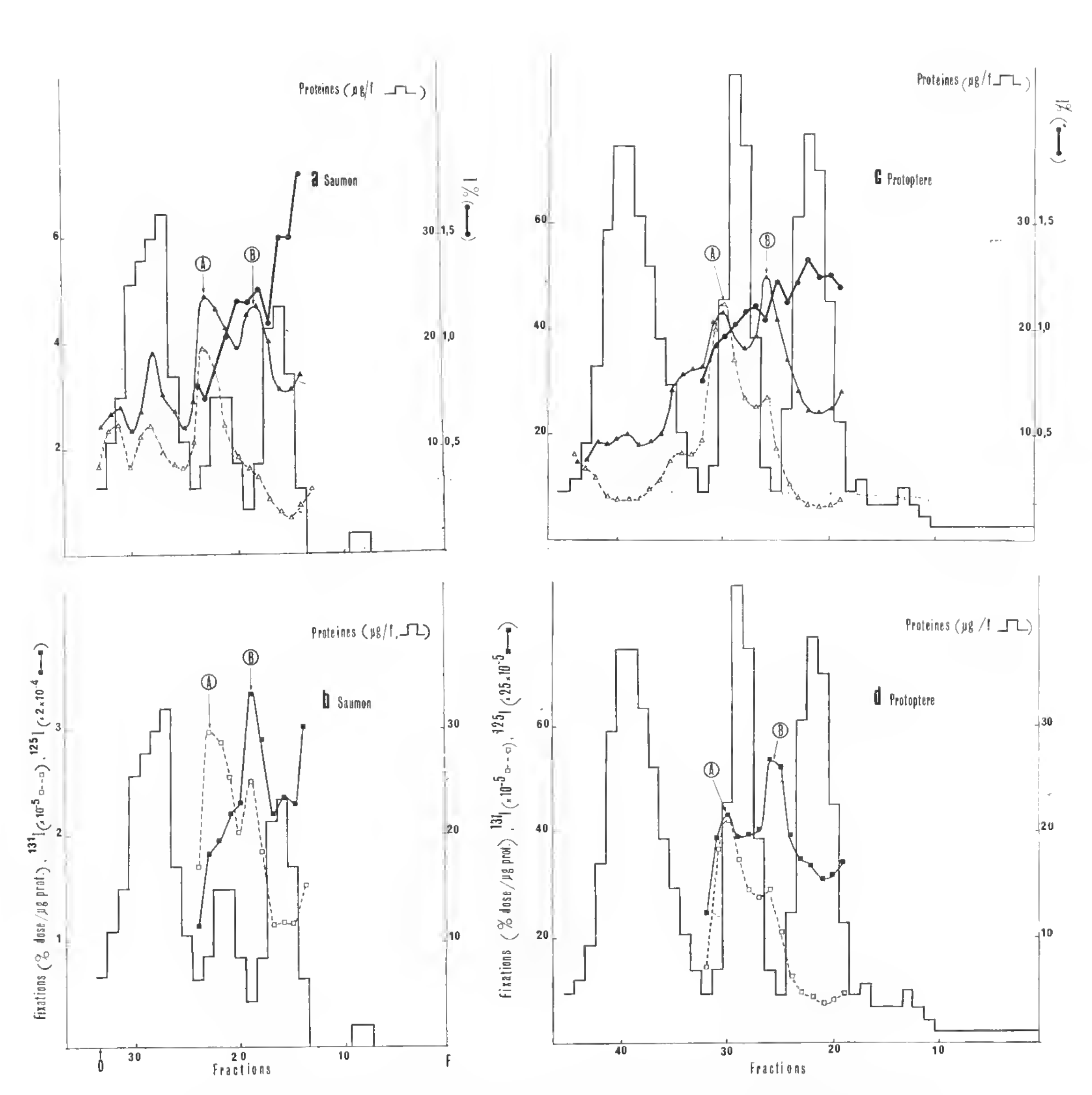


Fig. 30. — *RAS et fixation de l'iode en fonction du temps de marquage dans les protéines thyroïdiennes de Saumon et de Protoptère après dissociation par le SDS.*

L'importance relative de ces deux pics semble varier en fonction du temps. Quelques heures après l'injection de ^{131}I, la RAS du pic A est nettement supérieure à celle du pic B ; mais plusieurs jours après l'injection de ^{125}I, la RAS du pic B tend à devenir égale à celle du pic A.

En outre, dans le cas du Protoptère (fig. 30 e), les RAS des isotopes ^{125}I et ^{131}I, qui sont très faibles dans la zone 3-8 S, indiquent qu'une partie des molécules de TG_2 ou TG_4 de forte teneur en iode sont susceptibles de se dissocier en 3-8 S.

Discussion

Iodation et caractéristiques physico-chimiques de la thyroglobuline

Chez toutes les espèces étudiées, la thyroglobuline et son polymère TG_4 contenus dans une thyroïde semblent constitués, quels que soient les taux d'iodation moyens de ces protéines, par une population de molécules présentant des degrés divers d'iodation.

Les variations du taux d'iodation sont concomitantes de modifications du coefficient de sédimentation et de la structure quaternaire de la thyroglobuline.

D'après les résultats de de Crombrugghe *et al.* (1967) et de Schneider et Edelhoch (1971*a*, *b*) obtenus chez les Mammifères, l'accroissement de 1 S du coefficient de sédimentation, de la préTG non iodée à la TG_2 native, observé chez les Poissons, est vraisemblablement déterminé par une augmentation de la densité de la molécule résultant de l'incorporation des atomes d'iode en son sein. Ceci n'exclut cependant pas certaines modifications discrètes de la structure de cette protéine que doivent entraîner les réarrangements stériques dans la molécule lors des réactions de substitution de l'iode dans les résidus tyrosyls (Nunez *et al.*, 1966).

Par ailleurs, il a été généralement constaté que la proportion de thyroglobuline dissociable en présence d'agents dénaturants ou à pH alcalin est d'autant plus importante que la teneur en iode de la protéine est plus faible (Nunez *et al.*, 1966 ; Tarutani et Ui, 1969*a*, *b* ; Lachiver *et al.*, 1969 ; Andreoli *et al.*, 1969 ; Gavaret *et al.*, 1971 ; Rosenberg et Cavalieri, 1969, 1971). En accord avec ces données obtenues chez les Mammifères, le traitement par le SDS de la thyroglobuline des Poissons suggère qu'elle est constituée de deux sortes de molécules différant dans leur structure quaternaire :

— les unes faiblement iodées seraient composées de sous-unités associées entre elles par des liaisons non covalentes et seraient facilement dissociables en sous-unités ;

— dans les autres, dont le taux d'iodation moyen est plus élevé, les sous-unités seraient liées par des liaisons covalentes et ne seraient pas dissociées par le détergent.

Un des effets de l'iodation consisterait à favoriser la formation d'une ou de quelques liaisons covalentes entre les sous-unités. De Crombrugghe *et al.* (1966), de Crombrugghe (1968), Edelhoch *et al.* (1969), Andreoli *et al.* (1969) émettent l'hypothèse que ces liaisons sont de type disulfure. Cependant Tarutani et Ui (1969*a*) n'ont pas réussi à identifier la nature disulfure de ces liaisons covalentes. Valenta et Lissitzky (1971) ont constaté que les détergents, mais non les agents réducteurs, déterminent un déplissement et une dissociation partiels de la thyroglobuline iodée de Rat. Pour ces auteurs, l'incorporation

des atomes d'iode dans la molécule aurait pour effet de stabiliser les liaisons non covalentes plutôt que de créer des ponts disulfures.

Quelle que soit l'hypothèse à retenir, une corrélation entre la teneur en iode et la stabilité de la structure quaternaire des molécules semble exister, mais plusieurs données (EDELHOCH et LIPPOLDT, 1962 ; VALENTA *et al.*, 1968) indiquent que la relation entre ces deux paramètres n'est pas absolue. De plus, la mise en évidence d'une importante hétérogénéité d'iodation dans la fraction dissociée de la thyroglobuline des Poissons montre que des molécules présentant des taux d'iodation bien différents sont dissociables en sous-unités. En accord avec les observations de GAVARET *et al.* (1971) chez le Rat, la fraction dissociable d'une thyroglobuline donnée peut présenter une teneur moyenne en iode supérieure à celle de la fraction résistante d'une autre thyroglobuline originaire de la même espèce ou d'une espèce différente (tabl. XIII). Il est probable que les divers atomes de ^{127}I modifient plus ou moins la structure de la thyroglobuline selon la position où ils sont incorporés dans la molécule. La formation des iodothyronines pourrait être susceptible de jouer un rôle dans la stabilité de la thyroglobuline.

Renouvellement de l'iode dans les protéines thyroïdiennes. Représentation schématique en divers compartiments

La généralité de l'hétérogénéité d'iodation observée dans les thyroïdes des diverses espèces étudiées doit traduire l'existence d'un phénomène commun, consistant en l'halogénation continue des protéines thyroglobuliniques depuis leur biosynthèse jusqu'à leur hydrolyse.

La cinétique d'iodation des protéines thyroïdiennes, étudiée à l'aide des isotopes radioactifs de l'iode, permet de préciser les relations existant entre ces diverses molécules différant par leur taux d'iodation et leur structure.

D'après l'ensemble des résultats obtenus, la thyroglobuline peut être représentée schématiquement par deux compartiments C_1 et C_2 d'inégale importance et le polymère TG_4 par un autre compartiment C_3 (fig. 31).

— C_1 correspond aux molécules de TG_2 les moins iodées, de forte RAS, dissociables en sous-unités par le SDS, et représente 20 à 30 % de la thyroglobuline. Dans le cas du Saumon, la protéine TG_1 mise en évidence dans les extraits thyroïdiens avant traitement par le SDS, qui résulte peut-être de la dissociation des molécules de TG_2 les plus labiles, peut être classée dans le compartiment C_1 de RAS élevée.

— C_2 correspond aux molécules de TG_2 les plus riches en iode, de faible RAS et résistantes au détergent.

— Bien que de nature hétérogène, le polymère TG_4 ne constituant que 15 à 20 % des protéines totales solubles est représenté par un compartiment C_3.

La cinétique d'incorporation de l'iode radioactif tend à montrer que l'ensemble de ces divers compartiments participe au métabolisme de l'iode, mais que ces derniers présentent des vitesses d'halogénation k_1, k_2, k_3 différentes, telles que $k_1 > k_2 \geqslant k_3$.

Dans les premières heures après l'injection, la RAS de C_1 est 3 à 4 fois supérieure à celle de C_2 (tabl. XV), mais nettement inférieure à celle de l'iodure intrathyroïdien. Le

compartiment C_1, dont l'hétérogénéité d'iodation est très prononcée, contient en effet les molécules les moins iodées qui fixent le plus intensément l'halogène par µg de protéines. Ceci est en accord avec les résultats de INOUE et TAUROG (1970) obtenus chez le Rat, qui suggèrent que les molécules néosynthétisées et peu iodées jouent un rôle plus important dans l'organification de l'iodure que les molécules préexistantes riches en iode, stockées dans la glande.

En fonction du temps de marquage, les RAS des divers compartiments augmentent, tendent à s'égaliser entre elles (tabl. XV) et à atteindre la RAS de l'iodure intrathyroïdien.

Plusieurs jours après l'injection de ^{125}I, C_1 présente encore la RAS la plus élevée, du fait que la RAS de l'iodure intrathyroïdien chez les Poissons croît, puis reste constante ou diminue peu pendant le temps de l'expérimentation.

Les courbes de RAS dans la fraction dissociée de la thyroglobuline (fig. 30 a, c) montrent que le renouvellement de l'iode dans le compartiment C_1 est beaucoup plus hétérogène qu'il ne l'est dans la fraction résistante (C_2). Mais dans l'état actuel de nos données, aucune explication ne nous paraît valable pour interpréter la présence des pics de RAS, A et B, et leur évolution en fonction du temps de marquage.

L'accroissement de la RAS de C_2 résulterait de son iodation directe à partir de l'iodure intrathyroïdien, mais aussi de la transformation des molécules de C_1 dissociables en molécules résistantes au détergent, lorsqu'elles atteignent un certain degré d'iodation qu'il est difficile de préciser. Puis ces molécules, sous forme résistante, fixeraient l'iode plus lentement. Le compartiment C_1 peut donc être considéré comme le précurseur de C_2.

En ce qui concerne TG_4, l'évolution parallèle des RAS des compartiments C_2 (fraction résistante, tabl. XV) et de C_3 (TG_4, tabl. XII) en fonction du temps suggère en accord avec l'hypothèse de RALL *et al.* (1971) que le polymère TG_4 provient, au moins pro parte, de la polymérisation de molécules de TG_2 fortement iodées, résistantes au détergent. Cependant la mise en évidence d'une hétérogénéité au sein de TG_4 indique que ce polymère est également composé de molécules de thyroglobuline originaires du compartiment C_1.

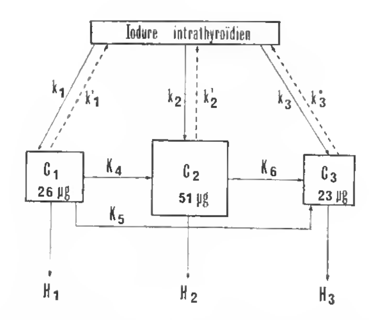


FIG. 31. — *Répartition de l'iode organique thyroïdien selon un modèle à trois compartiments.*
C_1 : Thyroglobuline TG_2 dissociable par le SDS ; C_2 : Thyroglobuline TG_2 résistante au SDS ; C_3 : TG_4 ($\simeq$ 27 S).

Les dimensions respectives de ces divers compartiments sont exprimées en µg de ^{127}I calculées pour 100 µg d'iode. Le cas d'un Protoptère est pris comme exemple.

Les résultats de Lissitzky *et al.* (1965) obtenus chez le Rat permettent de supposer que les hormones thyroïdiennes sont synthétisées dans les différents compartiments, puis sécrétées selon des vitesses H_1, H_2, H_3. Le recyclage de l'iodure marqué à partir de chacun des compartiments C_1, C_2, C_3, résultant de la désiodation des iodotyrosines libérées par hydrolyse est indiqué par les coefficients k'_1, k'_2, k'_3 (fig. 31).

Importance relative de ces divers compartiments thyroïdiens en fonction de l'état physiologique des animaux

Un tel schéma (fig. 31) peut être généralisé à la thyroïde des Mammifères, mais l'importance relative des divers compartiments doit varier avec l'état d'activation de la glande, dans la mesure où ce dernier conditionne l'halogénation des protéines.

En effet, l'hypophysectomie de Rats (Fontaine et Lachiver, 1964 ; Rosenberg et Cavalieri, 1969, 1971 ; Cavalieri *et al.*, 1970) ou l'immunisation de Lapins contre la TSH bovine (Lachiver *et al.*, 1969) semble entraîner une augmentation du compartiment C_1. Dans ces deux conditions expérimentales, la protéolyse de la thyroglobuline est ralentie, mais comme la synthèse de cette protéine n'est pas totalement supprimée, il y a accumulation d'une thyroglobuline néosynthétisée peu iodée, dont la structure est plus labile que celle de la protéine préexistant dans la glande.

Ces résultats permettent de penser que la dissociation plus élevée de la TG_2 des Saumons de frayères, après marquage in vivo pendant un temps donné, comparativement à celle de la TG_2 des Saumons de montée (fig. 28), reflète l'hypoactivité thyroïdienne (Olivereau, 1954) et le ralentissement du métabolisme iodé (Fontaine et Leloup, 1962) chez les Saumons d'hiver sur les aires de fraye.

Dans la thyroïde des Rats carencés en iode, le compartiment C_1 qui atteint 50 à 60 % du total, est augmenté par un mécanisme très différent. La stimulation très intense de la thyroïde de ces Rats par la TSH accélère les processus de synthèse et de protéolyse des molécules protéiques. La thyroglobuline néosynthétisée dans ces glandes carencées en iode, n'est que faiblement halogénée et une fraction relativement réduite de cette protéine est en mesure d'acquérir une structure stable, avant d'être hydrolysée.

La thyroglobuline des Saumons de frayères de l'hiver 1968-1969 constitue un cas particulier. Cette protéine, dont la teneur en iode est identique à celle des autres Saumons d'hiver, se dissocie en sous-unités 3-8 S en partie spontanément ou intégralement en présence de SDS. Il faut donc supposer qu'aucune liaison covalente intercaténaire ne se soit formée entre les chaînes peptidiques des sous-unités à moins que ceci ne soit dû à une activité endopeptidasique intense dans la thyroïde de ces Saumons. D'après les critères histologiques, Olivereau (1954) signale que l'hypoactivité des thyroïdes des Saumons de frayères est plus ou moins accentuée selon les années considérées. Un hypofonctionnement prononcé se traduit par une désintégration de nombreux follicules et la présence de colloïde dans les vaisseaux. Il est possible d'envisager que la structure anormalement labile de la TG_2 des Saumons de frayères 1968-1969 correspond à un état d'hypoactivité thyroïdienne particulier de ces Saumons.

Hétérogénéité fonctionnelle de la thyroïde

Nos résultats suggèrent que l'ensemble des protéines thyroglobuliniques participe au métabolisme iodé thyroïdien, mais que la vitesse de renouvellement de l'iode est variable dans les divers compartiments envisagés selon leur teneur en iode.

Peut-on attribuer à ces diverses iodoprotéines une localisation particulière dans la thyroïde ?

De nombreuses études autoradiographiques de la thyroïde de Rat ont été réalisées. La thyroglobuline après sa libération des polysomes, où elle est synthétisée, migre (Nadler *et al.*, 1964) jusqu'au(x) site(s) d'iodation intracellulaire pour Pitt-Rivers *et al.* (1964), Tixier-Vidal *et al.* (1969), Croft et Pitt-Rivers (1970), Fujita (1972), ou extracellulaire et localisé à l'interface cellule/colloïde selon Leblond et Gross (1948), Wollman et Wodinsky (1955), Nadler et Leblond (1955), Stein et Gross (1964), Loewenstein et Wollman (1967), Fujita (1972). La thyroglobuline est ensuite sécrétée dans la vésicule colloïde où elle est mise en réserve pendant un temps plus ou moins long, avant d'être réincorporée dans les cellules folliculaires par un mécanisme de pinocytose (Wollman, 1969 ; Fujita, 1970) qui aboutit à la libération des hormones thyroïdiennes.

Quels que soient la position exacte et le nombre de sites d'iodation au niveau de chaque follicule thyroïdien, les études autoradiographiques montrent que dans les premiers temps, après l'injection de ^{131}I, les petits follicules thyroïdiens et la périphérie de la colloïde des plus grands fixent plus intensément l'isotope radioactif. Le marquage des divers follicules varie aussi selon leur localisation dans la glande (Loewenstein et Wollman, 1970).

Des autoradiographies de thyroïdes de Saumon, Anguille, Truite et Congre marqués pendant plusieurs jours par ^{131}I (Olivereau, 1954) montrent également un noircissement de l'émulsion plus intense au niveau des petits follicules thyroïdiens. Peut-être des images typiques en anneaux auraient pu être observées à des temps de marquage plus courts.

La concentration de l'iode ^{127}I apparaît uniforme dans la thyroïde de Rat après équilibrage isotopique avec ^{125}I (Wollman, 1965 ; Loewenstein et Wollman, 1967). Il en résulte que dans les premiers temps, après l'injection, la RAS de ^{131}I est plus élevée dans les petits follicules et à la périphérie des plus grandes vésicules colloïdes.

D'après ces données, les iodoprotéines du compartiment C_1 de RAS élevée pourraient donc être localisées à ces niveaux et correspondre aux molécules de thyroglobuline de forte RAS libérées dans la cellule et/ou venant d'être sécrétées dans la colloïde au pôle apical des cellules.

Par ailleurs, les observations de Loewenstein et Wollman (1967) impliquent nécessairement, pour qu'un état d'équilibre soit maintenu dans la glande, que le renouvellement de l'iode est plus rapide dans ces zones de RAS élevée.

Or, dès 1958, Triantaphyllidis à partir d'études très différentes avait émis l'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle dans la thyroïde en constatant que l'iode radioactif quitte la glande plus rapidement que l'iode ^{127}I. Divers travaux sont venus ensuite étayer cette hypothèse. Schneider (1964), Rosenberg *et al.* (1966), Haibach et Kobayashi (1971) montrent que l'iode thyroïdien semble être sécrété selon le concept de « last come, first served » de Schneider. Pitt-Rivers et Cavalieri (1963), Haney et Lissitzky (1963),

Simon *et al.* (1964) observent que la RAS de l'iode des monoiodotyrosines libres dans la glande est supérieure à celle des monoiodotyrosines liées. Lissitzky (1964) envisage l'existence de deux formes de thyroglobuline dans lesquelles l'iode serait métabolisé à des vitesses différentes. Cette hétérogénéité vis-à-vis de la vitesse de renouvellement de l'iode peut correspondre à la fois à l'hétérogénéité inter- et intrafolliculaire.

Diverses hypothèses ont été émises pour expliquer une sécrétion sélective de l'iode dans la glande (Wollman, 1969). La protéolyse des iodoprotéines se réalisant à l'intérieur de la cellule (voir mise au point Wollman, 1969), la protéine néosynthétisée et récemment iodée, qui est localisée à proximité du pôle apical des cellules avant de diffuser lentement dans la colloïde, occupe une situation privilégiée pour être hydrolysée. Le concept de Schneider est très conciliable avec une telle répartition anatomique des iodoprotéines dans la glande.

A partir de ces données, on peut envisager qu'une partie des molécules peu iodées du compartiment C_1 sont les premières à être hydrolysées et à libérer les hormones thyroïdiennes. Mais, comme il semble que la teneur en thyroxine des protéines augmente avec leur degré d'iodation (Inoue et Taurog, 1968*a* ; Perlman et Edelhoch, 1967 ; de Crombrugghe *et al.*, 1967 ; Taurog, 1970), l'hydrolyse de chacune des molécules riches en iode des compartiments C_2 et C_3 est susceptible de libérer une plus grande quantité d'iodothyronines. S'il en est ainsi, en dépit d'une vitesse de renouvellement inférieure de l'halogène, les compartiments C_2 et C_3 pourraient jouer un rôle prépondérant dans la sécrétion des hormones thyroïdiennes.

IV. DIFFÉRENCES STRUCTURALES INTERSPÉCIFIQUES DES THYROGLOBULINES ET ASPECT ÉVOLUTIF

Dans la première partie de ce travail, nous avons vu que les protéines iodées thyroïdiennes présentent un spectre d'ultracentrifugation similaire chez les Vertébrés inférieurs et chez les Mammifères.

Il est en général admis que la constante de sédimentation de la thyroglobuline ne varie pas significativement chez de nombreuses espèces mammaliennes (Edelhoch et Rall, 1964). De ce fait, Roche *et al.* (1968) ont implicitement admis que la thyroglobuline des Vertébrés inférieurs présente un coefficient de sédimentation de 19 S comme la thyroglobuline des Mammifères. De plus Aloj *et al.* (1967) ont déterminé un poids moléculaire de 331 000 pour la sous-unité de la thyroglobuline de Lamproie (*Petromyzon fluviatilis*), valeur qui correspond à la moitié du poids moléculaire de la thyroglobuline des Mammifères.

Toutefois le problème de la non-identité de la thyroglobuline dans la série zoologique des Vertébrés pouvait être posé, comme dans le cas d'autres protéines.

Un certain nombre de données électrophorétiques et surtout immunologiques concernant les thyroglobulines mammaliennes (Robbins et Rall, 1960) suggéraient l'existence possible de différences spécifiques dans les propriétés physico-chimiques de ces thyroglobulines. Ceci nous a conduit à déterminer le coefficient de sédimentation de la thyroglobuline de diverses espèces appartenant à des classes différentes.

L'existence de différences interspécifiques du coefficient de sédimentation de la thyroglobuline (Lachiver *et al.*, 1965, 1966), que nous allons exposer maintenant, a pu être mise en évidence.

Nous avons cherché ensuite à interpréter ces différences. Le coefficient de sédimentation d'une macromolécule dépend essentiellement de trois paramètres : le poids moléculaire, la conformation générale et la densité.

Plusieurs hypothèses qui ne s'excluent d'ailleurs pas entre elles pouvaient donc être formulées.

1. Sachant que le coefficient de sédimentation de la thyroglobuline des Mammifères augmente sensiblement avec le taux d'iodation par suite de modifications dans la forme ou la densité de la molécule (Nunez *et al.*, 1966 ; de Crombrugghe *et al.*, 1967), on pouvait envisager en premier lieu que les différences interspécifiques de coefficient de sédimentation résultent simplement de variations dans les teneurs en iode des diverses thyroglobulines étudiées.

2. Les compositions en acides aminés et/ou les structures primaires des diverses thyroglobulines seraient variables et détermineraient des différences importantes de conformation.

3. Enfin le poids moléculaire varierait selon l'espèce.

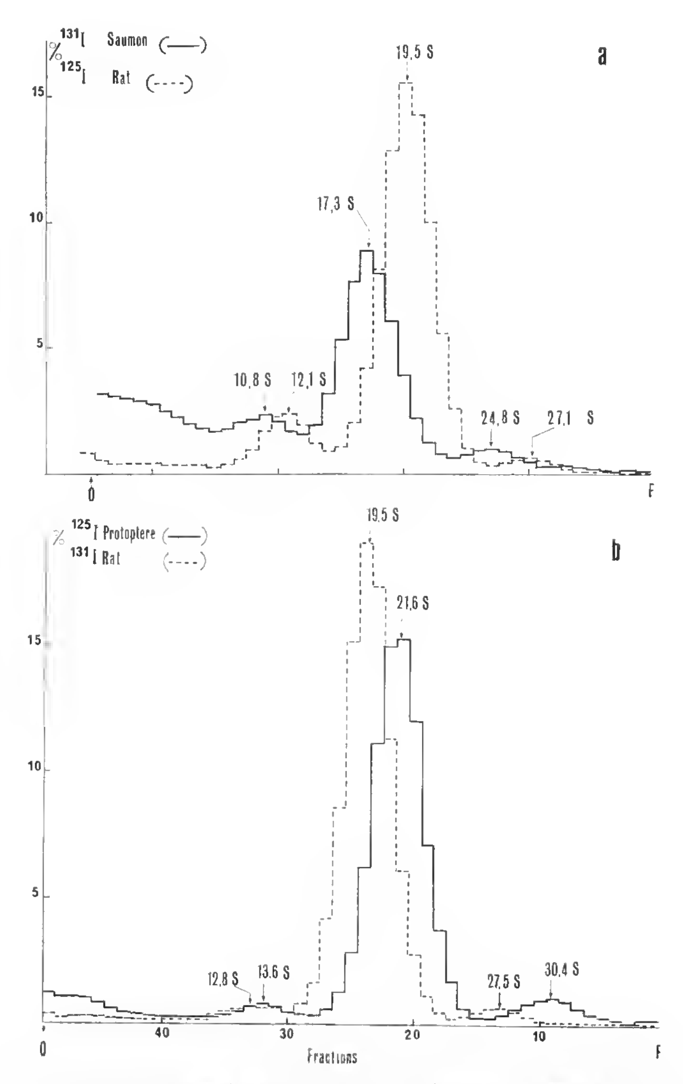


FIG. 32. — *Coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes de Saumon* (a) *et de Protoptère* (b) *marquées in vivo par l'iode radioactif.*

Détermination par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 % ; en tampon phosphate pH 7,4 ; μ 0,15) d'un mélange d'extraits thyroïdiens de Poisson et de Rat, chacun d'eux étant marqué par l'un des isotopes de l'iode. Centrifugation à 5°C pendant 5 h 30 à 39 000 tpm. Radioactivités : exprimées en pour cent des radioactivités déposées sur le gradient.

Abscisses : nombre de fractions recueillies (7 gouttes). O : sommet du gradient ; F : fond.

A. — Mise en évidence des variations interspécifiques des coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes chez les Poissons

Les coefficients de sédimentation des iodoprotéines thyroïdiennes marquées in vivo par l'iode radioactif et/ou natives des diverses espèces de Vertébrés inférieurs étudiées ont été systématiquement déterminés selon la technique de Martin et Ames (1961) (voir Techniques).

La figure 32 a montre que la ^{131}I TG_2 de Saumon présente un coefficient de sédimentation de 17,3 S nettement inférieur à celui de la TG_2 de Rat, dont le coefficient de sédimentation de 19,5 S a été évalué par référence à la TG_2 de Bœuf 19 S. Au contraire, la ^{125}I TG_2 de Protoptère (fig. 32 b) atteint un coefficient de sédimentation beaucoup plus élevé de 21,6 S.

Un exemple des résultats obtenus pour les TG_2 natives d'Anguille et de Protoptère est donné dans les figures 33 a et 33 b. On constate que le coefficient de sédimentation de la TG_2 native d'Anguille (19,2 S) est très voisin de celui de la TG_2 de Bœuf (19 S), mais que le coefficient de sédimentation de la TG_2 native de Protoptère (22,3 S) lui est très supérieur.

Pour chaque espèce, le coefficient de sédimentation déterminé pour la TG_2 contenue dans l'extrait thyroïdien salin ou pour cette protéine purifiée présente une valeur identique.

Toutes les déterminations ont été réalisées à 5°C. Mais à la suite des résultats de Schneider *et al.* (1970, 1971), l'influence éventuelle de la température de centrifugation sur les valeurs des coefficients de sédimentation des thyroglobulines des Poissons et des Mammifères a été envisagée.

Les coefficients de sédimentation des thyroglobulines de Rat et de plusieurs espèces de Poissons ont donc été déterminés à 5°C et 23°C afin de confronter les résultats obtenus à ces deux températures.

Un exemple est donné pour la thyroglobuline de Truite et de Rat soumis à un régime carencé en iode. Les valeurs respectives obtenues pour les coefficients de sédimentation de la ^{131}I TG_2 et de la TG_2 native de Truite (fig. 34 a, b) et de Rat (fig. 34 c, d) sont identiques après centrifugation à 23 ou 5°C. Les différences interspécifiques mises en évidence à ces deux températures expérimentales sont rigoureusement les mêmes. La TG_2 de Rat présente dans tous les cas un coefficient de sédimentation légèrement supérieur à celui de la TG_2 de Bœuf.

Les moyennes des coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes des diverses espèces étudiées, marquées in vivo par l'iode radioactif pendant quelques heures ou plusieurs jours, sont classées par ordre croissant dans le tableau XVI.

Les variations individuelles et celles résultant des faibles variations du coefficient de sédimentation (0,2 à 0,8 S) en fonction du temps de marquage (voir tabl. XIV) sont comprises dans l'erreur standard de la moyenne (s_m).

L'analyse de variance des données du tableau XVI est effectuée à l'aide du test F de Fischer (tabl. XVII).

Dans le cas des Poissons, des différences hautement significatives du coefficient de

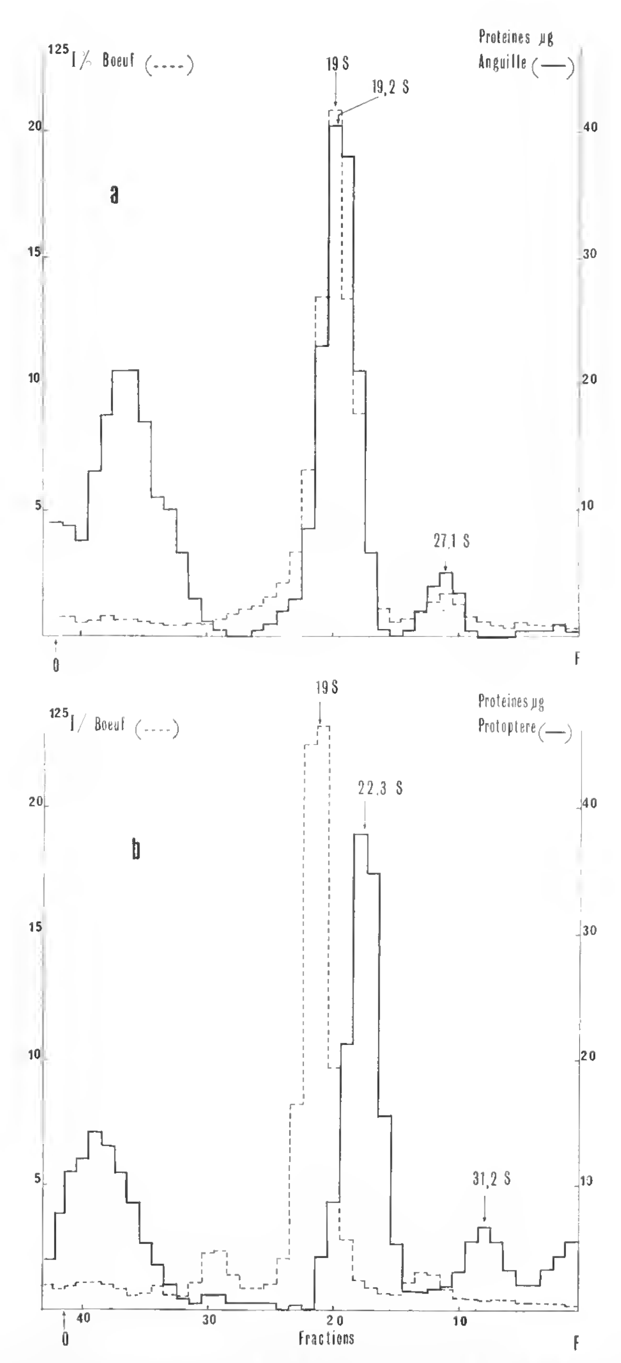


Fig. 33. — *Coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes natives d'Anguille et de Protoptère.* Un mélange d'extrait thyroïdien de Poisson et de solution de ^{125}I TG de Bœuf (19 S) est centrifugé en gradient de saccharose à 5°C pendant 2 h 15 à 65 000 tpm. Les protéines thyroïdiennes d'Anguille (a) et de Protoptère (b) sont identifiées selon Lowry *et al.* (1951).

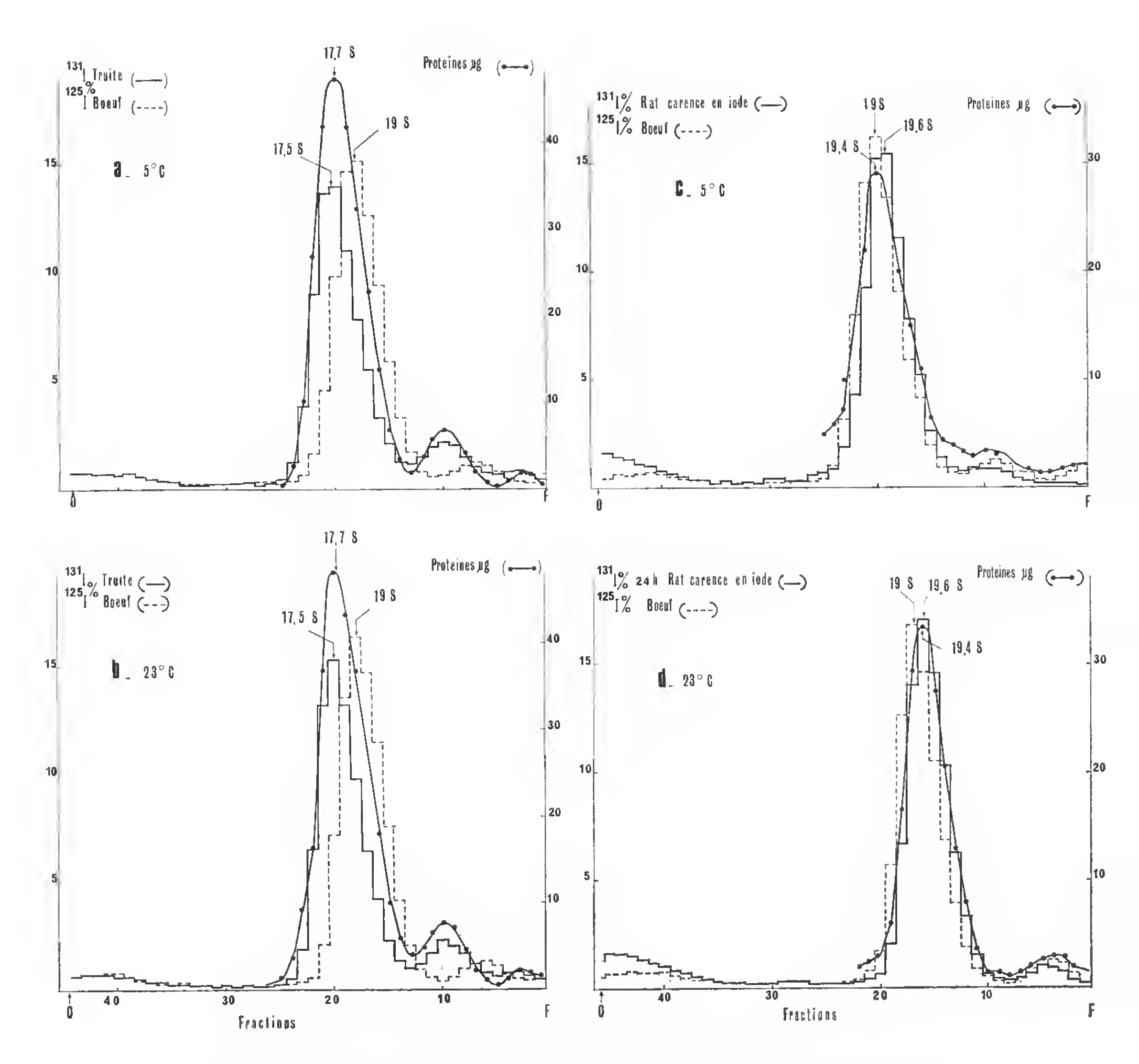


Fig. 34. — *Température de centrifugation et coefficients de sédimentation des iodoprotéines thyroïdiennes de Truite et de Rat.*
Les coefficients de sédimentation des thyroglobulines marquées in vivo par ^{131}I et natives de Truite (a, b) et de Rat soumis à un régime carencé en iode (c, d) sont déterminés à deux températures de centrifugation (5 et 23°C), en utilisant comme standard interne la ^{125}I TG de Bœuf (19 S). Centrifugation à 65 000 tpm pendant 2 h 15 à 5°C (a, c) ; centrifugation à 65 000 tpm pendant 1 h 45 à 23°C (b, d).

sédimentation sont observées non seulement pour la thyroglobuline TG_2, mais aussi pour la sous-unité TG_1 et le polymère TG_4.

Les coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes marquées ou natives des deux Salmonidés, Truite et Saumon, ne varient pas significativement entre eux. En revanche, ils sont très significativement inférieurs à ceux des protéines thyroïdiennes de l'Anguille et des divers Reptiles considérés. Chez ces Reptiles, appartenant à différentes sous-classes, les différences interspécifiques ne sont pas significatives.

Enfin les protéines thyroïdiennes de la Roussette et surtout du Protoptère présentent des coefficients de sédimentation très supérieurs à ceux des protéines des autres Poissons et des divers Reptiles et Mammifères étudiés.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que les coefficients de sédimentation respectifs de la sous-unité TG_1 et du polymère TG_4 varient selon l'espèce parallèlement à celui de la thyroglobuline TG_2.

Du test global F n'est décelée aucune variation significative du rapport des coefficients de sédimentation $\frac{TG_4}{TG_2}$ entre les diverses espèces de Poissons, Reptiles et Mammifères (tabl. XVI). La plus grande variabilité du rapport des coefficients de sédimentation de $\frac{TG_2}{TG_1}$ est probablement due à la moins bonne résolution des pics de TG_1 au cours de l'ultracentrifugation et au nombre plus restreint de valeurs obtenues.

TABLEAU XVI. — Coefficients de sédimentation par protéines thyroïdiennes de divers Vertébrés inférieurs, marqués in vivo par l'iode radioactif.

Espèces	Coefficients de sedimentation S									Rapport des coefficients de sedimentation					
	TG_1			TG_2			TG_4			TG_2 / TG_1			TG_4 / TG_2		
	N	M	$\pm S_m$	N	M	$\pm S_m$	N	M	$\pm S_m$	N	M	$\pm S_m$	N	M	$\pm S_m$
Truite de rivière	1	10,8	—	7	17,4	0,070	6	24,6	0,140	1	1.61	—	6	1.41	0,012
Saumon - montee	9	10,4	0,133	17	17,4	0,081	14	24,9	0,119						
- frayeres	6	10,7	0,067	6	17,4	0,086	6	25,0	0,248	16	1,66	0,016	21	1.43	0,005
- mended	1	10,8	—	1	17,3	—	1	25,0	—						
Anguille	4	11,4	0,131	7	19,0	0,117	7	26,5	0,298	4	1,67	0,019	7	1.40	0.017
Python	—	—	—	1	19,3	—	1	27,5	—						
Uromastix	—	—	—	3	19,4	0,120	2	28.6	0,300	4	1.65	0,013	6	1,45	0,018
Tortue	4	11,9	0,132	6	19,8	0,145	3	28,5	0,404						
Lamproie	2	13,0	0,750	3	19,8	0,058	3	27,5	0,689	2	1,53	0,089	2	1,39	0,038
Roussette (Manche)	4	12,9	0,217	5	21,0	0,098	3	30,2	0,384	4	1.63	0,029	3	1.44	0,014
Protoptere	5	13,4	0,102	8	21,8	0,159	7	30,7	0,469	5	1,62	0,011	7	1,41	0,016

(n), nombre d'animaux ; S_m, erreur standard de la moyenne.

Tableau XVII. — Analyse de variance des coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes de divers Vertébrés inférieurs.

Tests F	TG_1	TG_2	TG_4
Test global	HS	HS	HS
Poissons entre eux	HS	HS	HS
Reptiles entre eux	—	—	—
Saumon v.s Truite	nd	—	—
Anguille v.s Salmonidés	HS	HS	HS
Anguille v.s Roussette	HS	HS	HS
Roussette v.s Protoptère	S	S	—

Niveaux de signification : S, significatif au seuil de 5 % ; HS, hautement significatif au seuil de 1 % —, non significatif ; nd, non déterminé.

B. — Iodation et variations interspécifiques du coefficient de sédimentation de la thyroglobuline

L'existence de différences atteignant 4 à 5 S entre les coefficients de sédimentation moyens des thyroglobulines natives des Salmonidés et du Protoptère suggérait que ces différences interspécifiques ne résultaient pas de simples variations dans la teneur en iode de ces protéines.

Nous avons vérifié cette hypothèse :

— en montrant que les différences spécifiques du coefficient de sédimentation de la thyroglobuline sont indépendantes du degré d'iodation de cette molécule ;

— en mettant en évidence des variations interspécifiques des constantes de sédimentation des protéines thyroïdiennes non iodées, parallèles à celles des coefficients de sédimentation des protéines natives (Brisson-Martin et Lachiver, 1970).

1. Coefficients de sédimentation et taux d'iodation moyens des thyroglobulines

l'examen du tableau XVIII montre clairement que les différences interspécifiques du coefficient de sédimentation des thyroglobulines natives sont indépendantes du taux d'iodation moyen de ces protéines.

En effet :

— les thyroglobulines du Saumon de montée et de la Truite de mer, qui atteignent un degré d'halogénation aussi élevé que celui de la thyroglobuline des Roussettes pêchées dans la Manche, présentent cependant un coefficient de sédimentation très inférieur à celui de la TG_2 de ce Sélacien ;

— la thyroglobuline du Protoptère, dont le coefficient de sédimentation est le plus élevé parmi les diverses espèces étudiées, a néanmoins une teneur en iode inférieure à celle des espèces précitées ;

— les thyroglobulines de Rat soumis à un régime carencé en iode, d'Anguille, de Crocodile, de Python et de Bœuf dont les constantes de sédimentation sont voisines de 19 S, présentent des taux d'iodation moyens très différents.

En revanche, des variations intraspécifiques du coefficient de sédimentation de la thyroglobuline, de faible amplitude, sont vraisemblablement liées aux différences de teneur en iode dans les cas de la Roussette et du Rat. Toutefois pour le Saumon, le coefficient de sédimentation de la thyroglobuline reste sensiblement identique, malgré une variation importante du degré d'halogénation moyen de cette protéine aux deux étapes du cycle vital.

TABLEAU XVIII. — Coefficients de sédimentation et taux d'iodation moyens des thyroglobulines de divers Vertébrés.

NOMS COMMUNS DES ESPÈCES	Coefficient de sédimentation de la thyroglobuline native en S	Taux d'iodation moyen de la thyroglobuline en %
Truite de mer	17,7	1,45
Truite de rivière	17,7	1,05
Saumon de montée	17,7	1,57
Saumon de frayères	17,6	0,98
Crocodile	18,6	0,07
Bœuf	19,0	0,60
Anguille	19,2	0,77
Rat régime carencé en iode	19,6	0,22
Rat régime riche en iode	20,5	1,10
Python	19,7	0,35
Roussette (Méditerranée)	20,4	0,77
Roussette (Manche)	21,0	1,47
Protoptère	22,5	1,18

2. Variations interspécifiques des coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes néosynthétisées in vitro en présence d'antithyroïdiens

Les thyroïdes sont incubées en présence de ^{3}H-Tyr et d'antithyroïdiens, perchlorate de sodium (2 mM) et de propylthiouracile (1 mM) inhibiteur spécifique de l'iodation. Les protéines néosynthétisées dans ces conditions expérimentales ne sont donc pas iodées.

La confrontation des figures 35 a, b, c met en évidence l'existence de différences interspécifiques entre les coefficients de sédimentation des thyroglobulines et ceux de leurs sous-

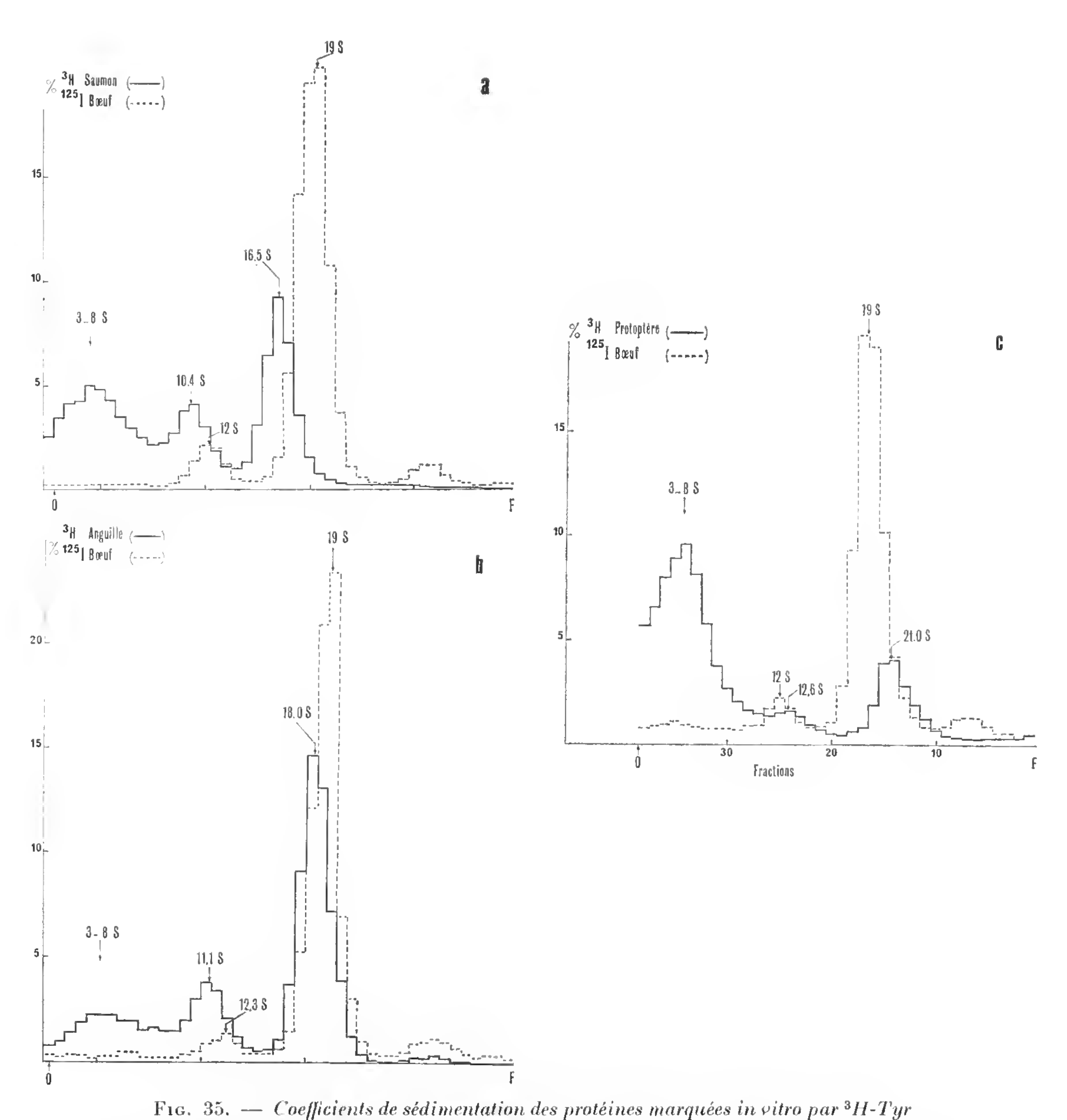


Fig. 35. — *Coefficients de sédimentation des protéines marquées in vitro par ^{3}H-Tyr dans la thyroïde de Saumon (a), d'Anguille (b) et de Protoptère (c).*

Le tissu thyroïdien est incubé dans du milieu de Campagne et Grüber à 15°C pour les Téléostéens, 30°C pour le Protoptère. Les coefficients de sédimentation sont déterminés par référence à la ^{125}I TG de Bœuf (19 S). Centrifugation à 5°C pendant 2 h 15 à 65 000 tpm. Fractions de 7 gouttes (a, b) et 10 gouttes (c).

unités synthétisées in vitro à des températures physiologiques pour chacune des espèces considérées.

En accord avec ces résultats, MAUCHAMP et NUNEZ (1968) ont constaté que les coefficients de sédimentation des thyroglobulines néosynthétisées in vitro de deux espèces d'Amphibiens sont légèrement différents (18,2 et 18,9 S).

Dans le tableau XIX sont données les valeurs moyennes des coefficients de sédimentation déterminés à 5°C, de la sous-unité et de la préTG marquées par ^{3}H-Tyr et des thyroglobulines natives pour les divers Vertébrés inférieurs étudiés.

Le coefficient de sédimentation de la ^{3}H-préTG non iodée est le plus généralement inférieur de 1 S à celui de la thyroglobuline native iodée correspondante. Les variations interspécifiques des coefficients de sédimentation des préTG sont sensiblement parallèles à celles observées pour ce paramètre dans le cas des thyroglobulines marquées in vivo par l'iode radioactif et natives.

TABLEAU XIX. — Coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes marquées in vitro par ^{3}H-Tyr et natives de divers Vertébrés inférieurs.

ESPÈCES	TEMPÉRATURE D'INCUBATION (°C)	COEFFICIENTS DE SÉDIMENTATION S		
		^{3}H sous-unité	^{3}H préTG	TG_2 native
Truite de rivière	15	—	16,8	17,7
Saumon	15	10,5	16,7	17,7
Anguille	25	11,1	18,2	19,2
Roussette	18	—	19,8	21,0
Protoptère	30	12,8	21,0	22,5
Python	30	—	18,4	19,7
Uromastix	38	—	18,6	19,5

C. — COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES THYROGLOBULINES DE DIVERSES ESPÈCES DE POISSONS

1. Purification des thyroglobulines

L'ultracentrifugation préparative en gradient de saccharose (fig. 36 a) et la filtration sur gel Sépharose 6 B ont été utilisées pour purifier quelques milligrammes de thyroglobuline de cinq espèces de Poissons.

Dans le cas de ces deux techniques les fractions correspondant à la thyroglobuline, comprises entre les flèches sur les figures 36 a et 36 c, sont réunies, puis concentrées sous vide dans des tubes de dialyse Visking afin d'obtenir des concentrations voisines de 10 mg/ml. Elles sont ensuite relarguées entre 1,4 et 2,2 M de sulfate d'ammonium ou 1,4 et 2,7 M pour la thyroglobuline de Protoptère.

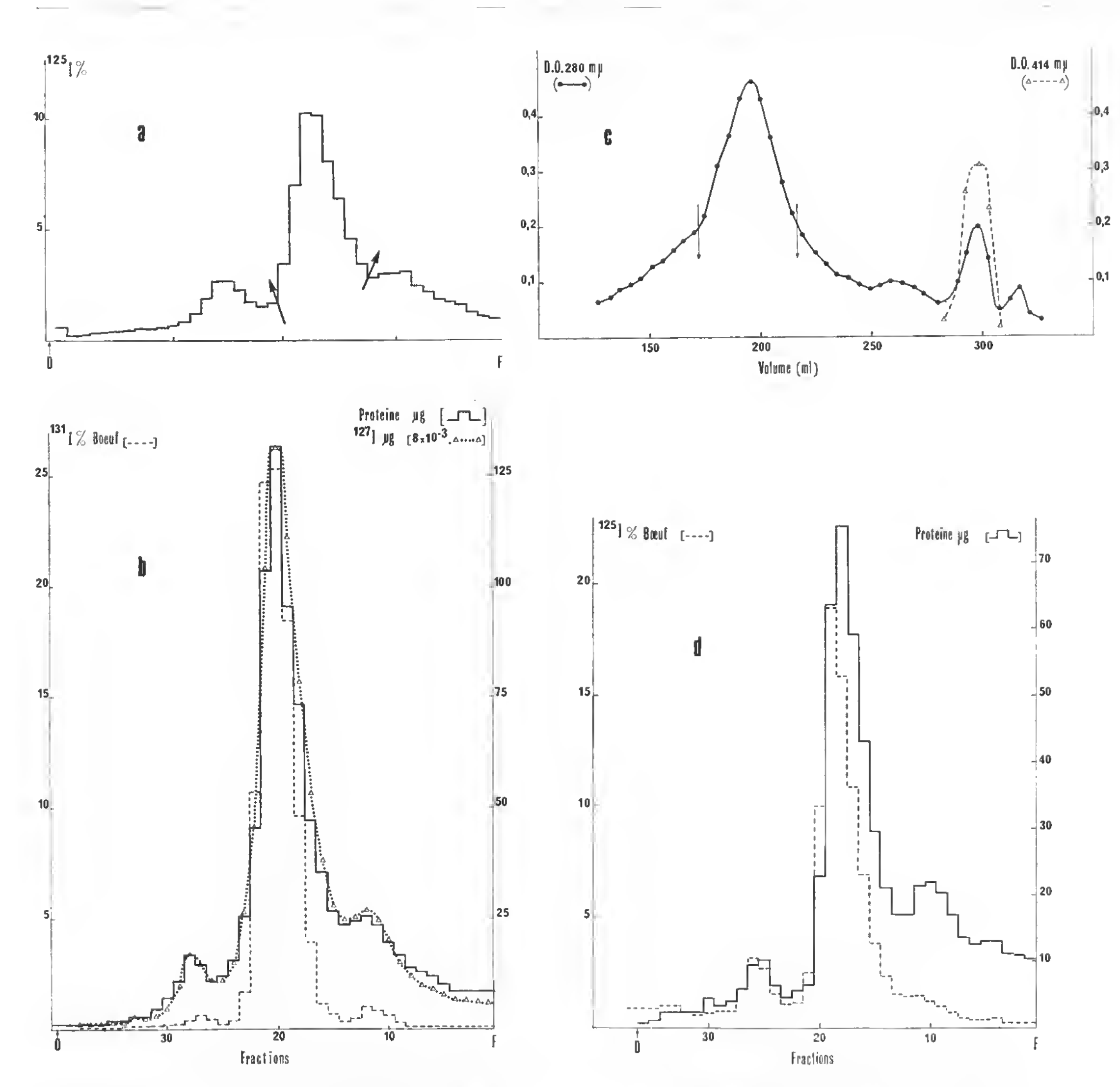


Fig. 36. — *Thyroglobuline d'Anguille purifiée par ultracentrifugation en gradient de saccharose* (a, b) *et par filtration sur gel Sépharose 6 B* (c, d).

Après dialyse prolongée contre du NaCl 0,001 M, les solutions de thyroglobuline sont lyophilisées et gardées dans un dessicateur à 5°C.

Les préparations obtenues sont analysées par ultracentrifugation en gradient de saccharose (fig. 36 b, d ; fig. 37 a, b, c). Les dosages de protéines et de ^{127}I sont réalisés dans chaque fraction des gradients.

Quelques μl d'une solution de ^{131}I ou ^{125}I TG_2 de Bœuf, de radioactivité spécifique élevée (10 000 cpm/μg protéine), sont ajoutés à l'état de trace comme standard interne.

Pour chaque espèce, le principal pic protéique présente un coefficient de sédimentation identique à celui déterminé pour la thyroglobuline présente dans l'extrait thyroïdien salin (fig. 37).

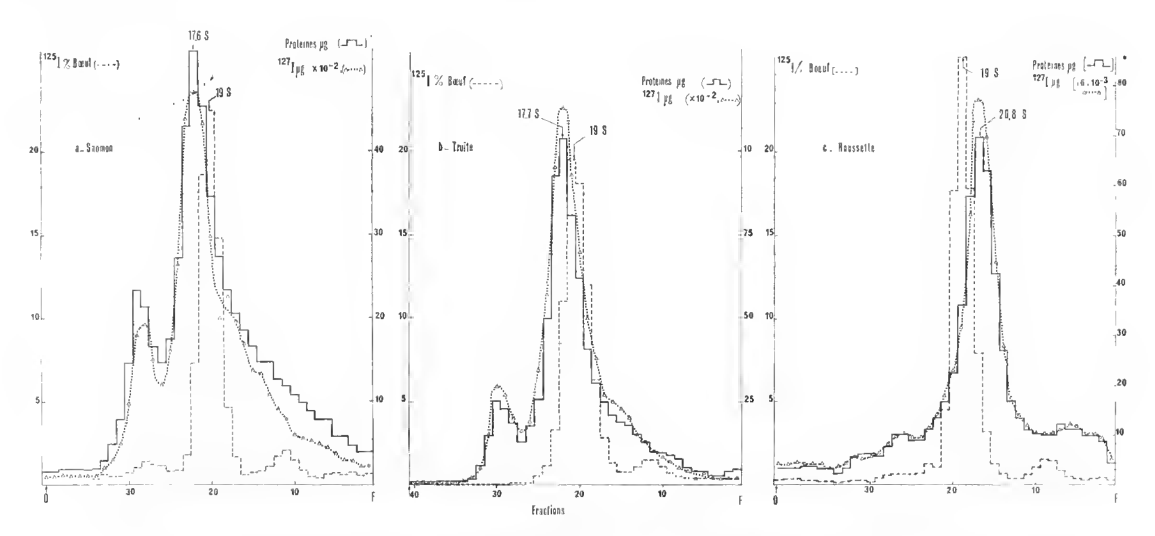


Fig. 37. — *Profils d'ultracentrifugation des thyroglobulines purifiées de Saumon* (a), *de Truite* (b) *et de Roussette* (c).

Quelle que soit la technique de purification utilisée, les profils d'ultracentrifugation des thyroglobulines purifiées sont très similaires (fig. 36 b, d). Dans tous les cas (fig. 36 et 37) les protéines étrangères de faible vitesse de sédimentation, présentes dans les extraits, sont éliminées. Des pics protéiques de vitesse de sédimentation inférieure et supérieure à celle de la thyroglobuline sont observés. Toutefois, la détermination d'une teneur en iode similaire dans ces pics et dans la thyroglobuline constitue un critère d'homogénéité de l'ensemble du matériel analysé et démontre son origine thyroglobulinique. La présence de différents pics protéiques est probablement due à la dialyse prolongée contre des solutions de faible force ionique (NaCl 0,001 M) qui entraîne une dissociation et une aggrégation partielles de la thyroglobuline (Spiro, 1961).

2. Composition en acides aminés des différentes thyroglobulines

Compositions centésimales

Pour chaque espèce considérée, plusieurs préparations de thyroglobuline ont été analysées ; quelle que soit la méthode de purification utilisée, les résultats obtenus sont identiques.

Dans le tableau XX sont données les compositions centésimales des thyroglobulines de Bœuf et des cinq Poissons étudiés. Les résultats sont exprimés, pour chaque acide aminé, en pour cent du poids sec de la protéine hydrolysée, en mg/100mg. Les rendements obtenus

après hydrolyse de ces diverses thyroglobulines sont voisins de 84 % du poids sec de la protéine hydrolysée. Ils atteignent environ 95 %, si l'on suppose que les taux moyens en tryptophane, iode et glucides sont respectivement voisins de 3, 1 et 7 %.

La teneur en eau de la thyroglobuline de Bœuf a été évaluée en déterminant la perte de poids d'une vingtaine de mg de cette protéine lyophilisée, portée à l'étuve à 80°C jusqu'à poids constant. Elle est égale à 5,2 % ; cette valeur a été adoptée pour les thyroglobulines de Poissons.

Les données obtenues pour la composition en acides aminés de la thyroglobuline bovine sont en accord avec celles rapportées par Piez et Morris (1960), Rolland *et al.* (1966) et Spiro (1970).

Tableau XX. — Composition en acides aminés des thyroglobulines des différentes espèces étudiées (en mg/100 mg).

Acides amines	Bœuf 19 S	Truite 17,7 S	Saumon 17,7 S	Anguille 19,2 S	Roussette 21 S	Protoptere 22,5 S
Lys	2,79	3,22	3,25	3,35	4,51	4,78
His	1,51	2,32	2,23	1,81	2,19	2,22
Arg	8,04	6,91	6,44	7,05	5,44	4,21
Asp	6,25	7,02	7,00	7,69	8,34	8,59
Thr	4,09	4,42	4,62	4,59	4,75	5,20
Ser	6,94	6,64	6,64	5,77	5,63	7,37
Glu	13,23	13,32	13,19	12,42	11,84	12,03
Pro	6,16	6,10	5,18	5,30	4,78	4,22
Gly	3,42	3,67	3,44	3,37	3,41	2,99
Ala	4,87	4,68	4,14	4,30	3,24	2,88
½ Cys	3,35	1,95	2,91	1,47	1,66	2,70
Val	5,14	6,51	5,82	5,65	5,13	5,53
Met	0,97	1,41	1,66	1,29	1,24	1,38
Ile	2,19	1,90	1,88	2,16	3,65	3,43
Leu	8,33	9,40	8,80	8,43	8,02	7,26
Tyr	2,77	2,54	2,58	2,22	3,08	2,96
Phe	5,94	4,57	4,36	5,16	6,00	6,11
Total	85,99	86,58	84,14	82,03	82,91	83,86
$\bar{V}$	0,724	0,724	0,725	0,729	0,730	0,726

Chaque nombre correspond à la moyenne des valeurs maximales obtenues pour 22 h ou 48 h d'hydrolyse selon l'acide aminé considéré. Les valeurs données pour la thréonine et la sérine sont extrapolées au temps zéro selon la méthode des moindres carrés. $\bar{V}$: volume spécifique partiel des thyroglobulines, évalué selon Cohn et Edsall (1943).

Bien que les compositions en acides aminés des diverses thyroglobulines présentent une certaine similitude avec celle de la thyroglobuline bovine, l'étude statistique des résultats du tableau XX met en évidence l'existence de variations très significatives dans les teneurs en de nombreux résidus (tabl. XXI). L'analyse de variance, selon le test F de Fischer, est réalisée pour chaque acide aminé pris séparément, en établissant un certain

nombre de comparaisons indépendantes les unes des autres (tabl. XXI). Les valeurs obtenues pour la 1/2 cystine sont trop hétérogènes pour permettre un calcul statistique.

La comparaison globale des données obtenues pour les diverses thyroglobulines étudiées montre que les pourcentages de thréonine, acide glutamique et glycine sont les seuls à ne pas présenter globalement de variations significatives.

Nous avons étudié les variations de la composition de la thyroglobuline chez les Poissons en considérant d'une part les relations phylogéniques des espèces étudiées et d'autre part les coefficients de sédimentation de cette protéine. La thyroglobuline de Bœuf est également confrontée à celles des divers Poissons, par ordre croissant de coefficient de sédimentation (tabl. XXI).

Tableau XXI. — Analyse de variance de la composition en acides aminés des thyroglobulines des diverses espèces étudiées.

Acides aminés	Comparaison globale	Saumon 17,7 / 17,7 Truite	Anguille 19,2 / 17,7 Saumon +Truite	Protoptère 22,5 / 17,7 Saumon + Truite	Roussette 21 / 17,7 Saumon +Truite	Protoptère 22,5 / 21 Roussette	Bœuf 19 / 19,2 Anguille	Bœuf 19 / 17,7 Saumon + Truite	Bœuf 19 / 22 Protoptere +Roussette
Lys	THS	—	—	S	S	—	HS	S	THS
His	S	—	THS	—	—	—	S	S	~ S
Arg	THS	S	—	THS	THS	THS	S	THS	THS
Asp	THS	—	—	THS	S	—	S	S	THS
Thr	—	—	—	—	—	—	—	—	S
Ser	S	—	S	—	~ S	S	S	—	—
Glu	—	—	—	THS	THS	—	—	—	S
Pro	S	S	—	S	—	—	—	—	S
Gly	—	—	—	S	—	HS	—	—	S
Ala	THS	—	—	THS	THS	~ S	—	—	THS
½ Cys									
Val	THS	S	~ S	~ S	THS	—	S	THS	—
Met	THS	—	—	—	—	—	THS	HS	HS
Ile	THS	—	—	THS	THS	HS	—	—	THS
Leu	THS	S	~ S	THS	THS	HS	—	S	S
Tyr	S	—	—	—	S	—	THS	—	—
Phe	THS	—	S	THS	THS	—	—	THS	—

S, à la limite de signification p ≃ 5 % ; S, significatif si 5 < p < 1 % ; HS, hautement significatif si 1 < p < 0,5 % ; THS, très hautement significatif si p < 0,5 %.

Les comparaisons réalisées entre les thyroglobulines de Poissons de plus en plus éloignés phylogénétiquement montrent que :

a — Les thyroglobulines des deux Salmonidés étudiés appartenant au genre *Salmo*,

dont les coefficients de sédimentation sont identiques (17,7 S), présentent des compositions très similaires. Des différences, seulement significatives (S), sont observées pour quatre résidus : Arg, Pro, Val, Leu.

b — La comparaison de la thyroglobuline d'Anguille 19,2 S à celle des deux Salmonidés, ces divers Poissons faisant partie du super-ordre des Téléostéens, ne met en évidence qu'une variation très hautement significative (THS) au niveau de l'histidine et quatre autres S ou à la limite de signification ($\simeq$ S).

c — Entre les thyroglobulines du Protoptère et des Salmonidés appartenant respectivement aux sous-classes des Dipneustes et des Actinoptérygiens, mais dérivant de lignées phylétiques distinctes (Grassé, 1958) et dont les coefficients de sédimentation atteignent les valeurs extrêmes de 22,5 et 17,7 S, les compositions en acides aminés sont beaucoup plus dissemblables. Les variations pour sept résidus sont THS et quatre autres sont S ou $\simeq$ S.

d — Pour les thyroglobulines de Poissons n'appartenant pas à la même classe, c'est-à-dire : Roussette (Chondrichthyens) *versus* Salmonidés ou Protoptère (Ostéichthyens), les résultats obtenus diffèrent en fonction des écarts des coefficients de sédimentation existant entre les thyroglobulines considérées.

En effet :

— Les compositions en acides aminés des thyroglobulines de Roussette et des Salmonidés, protéines dont les coefficients de sédimentation diffèrent de $\simeq$ 3 S, varient consi-

Tableau XXII. — Distribution des acides aminés selon leur caractéristique chimique dans les différentes thyroglobulines analysées. Calcul de l'hydrophobicité moyenne et de la fraction des résidus ionisés dans ces thyroglobulines, selon Welscher (1969).

Caracteristique chimique	Boeuf	Truite	Saumon	Anguille	Roussette	Protoptere
	Moles/100 moles d'acides aminés totaux					
Aliphatiques						
non polaires	34.2	36,4	34.6	35,4	34,1	31,4
hydroxyles	15,0	14.8	15,5	14,6	14,7	17,7
Aromatique hydroxylé (Tyr)	2,1	1,9	2,0	1,7	2,4	2,3
Dicarboxyliques	19,6	20,3	20,8	21,5	21,6	21,8
Basiques	10,4	10,5	10,4	11,0	11,2	10,4
Imidazol (Pro)	7,9	7,8	6,8	7,2	6,5	5,6
Soufre (Met)	0,9	1,3	1,6	1,3	1,2	1,3
Hydrophobicite moyenne HØ cal./res.	1036	1021	994	1019	1065	1020
Fraction des res. ionisés FCh unitescharge/res.	0,30	0,31	0,31	0,32	0,33	0,32
Rapport HØ/FCh	5,33	5,39	5,23	5,07	5,07	5,14

Aliphatiques non polaires : Gly, Ala, Val, Leu, Ile ; Aliphatiques hydroxylés : Thr, Ser ; Dicarboxyliques : Asp, Glu ; Basiques : Lys, His, Arg ; Hydrophobicité moyenne : HØ de chaque résidu/résidus totaux ; Fraction des résidus ionisés : résidus basiques + acides/résidus totaux.

dérablement. Comme dans le cas précédent sept variations THS et quatre autres S ou $\simeq$ S sont mises en évidence et souvent pour les mêmes acides aminés.

— Les thyroglobulines de Protoptère et de Roussette dont les coefficients de sédimentation, sans être identiques, sont cependant nettement supérieurs à 19 S, présentent des compositions beaucoup plus voisines. Seules, les variations dans les teneurs en Gly, Leu, Ile sont HS et THS pour l'arginine.

En outre, la comparaison de la thyroglobuline mammalienne à celles des divers Poissons montre que les différences observées sont d'autant plus nombreuses et plus significatives que les coefficients de sédimentation des thyroglobulines considérées sont plus éloignés (tabl. XXI).

Distribution des acides aminés selon leur caractéristique chimique

Dans le tableau XXII est donnée la distribution des acides aminés, classés selon leur caractéristique chimique, dans les différentes thyroglobulines considérées.

On constate :

— Bien que les teneurs en acides aminés basiques varient considérablement selon l'espèce, les proportions globales de résidus basiques dans les diverses thyroglobulines étudiées, sont peu différentes.

— Les teneurs en acides aminés dicarboxyliques sont sensiblement plus élevées dans les thyroglobulines des Poissons que dans celle de Bœuf, ceci résultant d'une augmentation du taux d'acide aspartique. D'après les rapports résidus basiques/résidus acides, les thyroglobulines de Protoptère et de Saumon semblent être les plus acides.

— L'hydrophobicité moyenne des différentes thyroglobulines et la fraction des résidus ionisés qu'elles contiennent ont été calculées selon WELSCHER (1969). Les valeurs obtenues pour la fraction des résidus ionisés (FCh) exprimée en unités de charge/résidu sont maximales, puisque les analyses effectuées ne permettent pas de distinguer l'asparagine et la glutamine des acides correspondants. Le rapport de ces deux paramètres HØ/FCh est sensiblement constant.

Par ailleurs, les volumes spécifiques partiels $\overline{V}$ de ces thyroglobulines, évalués selon COHN et EDSALL (1943) à partir de leurs compositions centésimales et des volumes spécifiques partiels de chacun des acides aminés qui les constituent, sont sensiblement identiques (tabl. XX).

Confrontation des compositions des thyroglobulines de Vertébrés représentant différentes classes de Gnathostomes

Dans le tableau XXIII, les teneurs en acides aminés des thyroglobulines des divers Poissons et celles que nous avons obtenues pour un Reptile (Python) et un Mammifère (Bœuf) sont exprimées en moles/100 moles d'acides aminés totaux afin de pouvoir les comparer à celles des thyroglobulines d'un Amphibien (*Xenopus laevis*), de deux Oiseaux (Poulet, Canard) et d'un autre Mammifère (Homme) données par HOSHINO et UI (1970) et ROLLAND *et al.* (1966).

Tableau XXIII. — Composition en acides aminés des thyroglobulines de divers Vertébrés appartenant à différentes classes.

Acides amines	Truite 17.7 S	Saumon 17,7 S	Anguille 19,2 S	Roussette 21 S	Protoptere 22,5 S	Xenopus* 19,3 S	Python 19, 3 S	Canard** 19 S	Poulet* 19,5 S	Boeuf 19 S	Homme* 19 S
Lys	3,1	3,2	3,4	4,6	4,8	5,0	4,4	3,9	3,7	2,7	3,4
His	2,0	2,0	1,7	2,1	2,1	2,3	1,2	1,1	1,1	1,3	1,4
Arg	5,4	5,2	5,9	4,5	3,5	4,0	4,9	4,7	4,2	6,4	5,9
Asp	7,5	7,7	8,8	9,5	9,7	10,5	9,7	9,2	9,6	6,8	8,4
Thr	5,4	5,8	5 9	6,2	6,7	5,7	5,3	5,2	5,3	5,0	5,4
Ser	9,4	9,7	8,7	8,5	11,0	9 7	7,6	10,1	8,9	10,0	9,7
Glu	12,8	13,1	12,7	12,1	12,1	11,7	14,2	13,5	12,2	12 8	13,1
Pro	7,8	6,8	7,2	6,5	5,6	5,7	6,8	5,3	9,7	7,9	7,1
Gly	7,9	7,7	7,7	7,8	6,8	7,3	7,3	7,9	7,3	7,5	7,7
Ala	8,1	7,4	7,9	6,0	5,2	5,7	6,5	6,1	6,3	8,6	7,6
½Cys	2,3	3,6	1,8	2,1	3,4	2,4	2,0	4,0	2,6	4,1	2,6
Val	8,1	7,5	7,5	6,8	7,2	6,2	6,1	6,1	5,8	6,5	6,4
Met	1,3	1,6	1,3	1,2	1,3	1,8	1,2	1,5	1,3	0,9	0,4
Ile	2,0	2,1	2,5	4,2	3,9	4,2	4,4	3,8	4,2	2,4	2,9
Leu	10 3	9,9	9,8	9,3	8,3	9,3	9,8	9,2	8,9	9,2	9,5
Tyr	1,9	2,0	1,7	2,4	2,3	2,5	2,5	3,4	3,2	2,1	2,2
Phe	3,8	3,7	4,6	5,3	5,4	5,9	5,8	5,3	5,5	5,0	5,3

Les résultats sont exprimés en moles/100 moles d'acides aminés totaux. ** Données de Rolland *et al.*, 1966 ; * données de Hoshino et Ui, 1970.

On constate :

— Bien que les coefficients de sédimentation des thyroglobulines de l'Amphibien, du Reptile et des deux Oiseaux soient voisins de 19 S, il existe un degré de similitude très remarquable entre les thyroglobulines de ces quatre Vertébrés avec celles de la Roussette et du Protoptère. Leurs compositions diffèrent très nettement de celles des thyroglobulines des trois Téléostéens et de celles des Mammifères par leurs teneurs en Lys, Arg, Asp, Pro, Ala et Ile.

— En accord avec les résultats du tableau XXII, les thyroglobulines des Téléostéens ont une composition en acides aminés plus proche de celles des Mammifères que de celles des autres Vertébrés considérés, mais présentent des teneurs en Val et Phe différentes de l'ensemble des autres espèces étudiées.

— Par ailleurs, les teneurs en Met des thyroglobulines des Poissons n'apparaissent pas supérieures à celles des thyroglobulines mammaliennes, lorsque l'on considère également la thyroglobuline humaine.

Discussion

L'existence de différences interspécifiques du coefficient de sédimentation est mise en évidence chez les Poissons non seulement aux niveaux de la thyroglobuline TG_2 et du polymère TG_4, mais aussi à celui de la sous-unité TG_1.

Chez les diverses espèces de Poissons considérées, les rapports respectifs des coefficients de sédimentation de $\frac{TG_2}{TG_1}$ et de $\frac{TG_4}{TG_2}$ sont sensiblement identiques et égaux aux valeurs correspondantes déterminées chez les Reptiles et les Mammifères. Ceci suggère que le mode de polymérisation des chaînes peptidiques de la sous-unité au polymère de la thyroglobuline est vraisemblablement identique dans toute la série des Vertébrés.

Ces différences spécifiques entre les coefficients de sédimentation des thyroglobulines natives sont indépendantes de leur taux d'iodation et suggèrent donc que ces protéines ne sont pas identiques dans la série des Vertébrés, comme semble le montrer l'analyse de la composition en acides aminés des diverses thyroglobulines étudiées.

Des données immunochimiques relativement anciennes avaient suggéré l'existence de différences dans la structure de la thyroglobuline de diverses espèces de Mammifères. Ces thyroglobulines présentaient entre elles un degré plus ou moins élevé de parenté antigénique selon les relations phylogéniques des espèces considérées (Hektoen *et al.*, 1927 ; Adant et Spehl, 1934 ; Stokinger et Heidelberger, 1937 ; Yagi et Kodama, 1955). En effet, les propriétés antigéniques des thyroglobulines de Mouton et de Bœuf, de Porc et de Cheval sont très voisines, mais bien différentes de celles de la thyroglobuline humaine. Récemment, Hoshino et Ui (1970) ont constaté aussi l'existence de relations antigéniques plus étroites entre les thyroglobulines de l'Homme et du Singe, mais beaucoup plus faibles entre la thyroglobuline humaine et celles du Rat, du Porc et de la Baleine.

Au cours de ces dernières années, Pierce (1965), Rolland *et al.* (1966), Spiro (1970), Hoshino et Ui (1970) ont analysé les compositions en acides aminés de quelques thyroglobulines mammaliennes. Ces auteurs constatent qu'elles présentent un plus ou moins grand degré de similitude dans leur composition. Ainsi, celle de la thyroglobuline humaine est quasi identique à celle du Singe (Hoshino et Ui, 1970), mais sensiblement différente de celles des animaux de bétail, des Rongeurs (Rolland *et al.*, 1966) et de la Baleine (Hoshino et Ui, 1970).

Très peu de travaux ont concerné les thyroglobulines de Vertébrés non mammaliens. Cependant, Hektoen (1927), Yagi et Kodama (1955), Hoshino et Ui (1970) ont observé une absence totale de « réactions croisées » entre les thyroglobulines de Vertébrés appartenant à des classes différentes. Les thyroglobulines de Mammifères, d'Oiseaux (Poulet), d'Amphibiens (*Xenopus laevis*) semblent ne présenter aucune parenté antigénique entre elles et avoir des compositions en acides aminés assez différentes (Hoshino et Ui, 1970).

L'analyse de la composition en acides aminés des thyroglobulines de divers Poissons et d'un Reptile a permis de constater que la thyroglobuline présente une composition globale similaire dans l'ensemble de la série des Vertébrés Gnathostomes (tabl. XXIII). Cependant un examen plus minutieux des données obtenues (tabl. XXI et XXIII) met

en évidence l'existence de variations très significatives des teneurs en de nombreux acides aminés : basiques (Lys, Arg), acides (Asp) et hydrophobes (Pro, Ala, Ile, Leu, Phe).

L'analyse de variance des résultats obtenus pour les thyroglobulines des cinq Poissons étudiés et celle de Bœuf semblait montrer que les compositions de ces protéines étaient d'autant plus différentes que les thyroglobulines considérées présentaient des coefficients de sédimentation plus éloignés (tabl. XXI).

Toutefois, la confrontation des données obtenues pour les diverses espèces animales représentant les différentes classes de Vertébrés Gnathostomes montre qu'un degré de similitude remarquable est observé entre la thyroglobuline de Protoptère (22,5 S) et celles de *Xenopus*, du Python et des Oiseaux, dont les coefficients de sédimentation sont voisins de 19 S. Il est donc clair que l'importance des variations dans les compositions en acides aminés des thyroglobulines n'est pas directement liée aux écarts existant entre les coefficients de sédimentation de ces protéines.

En revanche, si nous considérons l'arbre phylétique des Vertébrés (fig. 38), il apparaît nettement que ces variations sont en rapport avec les relations phylétiques des espèces étudiées. Les formes rangées sous le nom de Poissons appartiennent en fait à trois séries évolutives indépendantes : les Élasmobranches (Chondrichthyens), les Actinoptérygiens (Téléostéens) et les « Choanichthyens » dont les Oiseaux et les Mammifères sont les branches terminales.

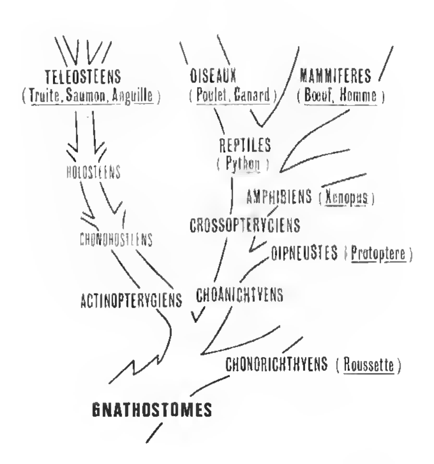


Fig. 38. — *Arbre phylétique simplifié des Vertébrés Gnathostomes. D'après* Grassé, *1958.*

L'évolution de la structure des protéines dans l'arbre phylogénétique des Vertébrés (Acher, 1967) a été étudiée pour diverses molécules de faible poids moléculaire (hormones neurohypophysaires, cytochromes, hémoglobines, insulines) dont les structures primaires ont pu être déterminées. Il semble que les mécanismes de duplication et de substitution sont essentiels dans l'évolution des protéines, en donnant naissance à diverses lignées évolutives à partir d'une molécule ancestrale. Dans chaque cas étudié, la structure primaire varie dans l'échelle zoologique des Vertébrés, mais à l'homologie de fonction correspond une homologie de structure. Il apparaît que la longueur des chaînes peptidiques constitue le caractère le plus stable et que la fréquence des substitutions est plus élevée dans certaines

positions des chaînes. Par exemple, l'insuline de divers Téléostéens est composée de 51 résidus comme celle des Mammifères, mais alors que les structures primaires de cette protéine sont très similaires dans chacun de ces groupes zoologiques, les insulines des Téléostéens diffèrent nettement de celles des Mammifères par leur séquence en acides aminés (Ryle *et al.*, 1955 ; Brown *et al.*, 1955 ; Grant et Reid, 1968 ; Neuman et Humbel, 1969 ; Neuman *et al.*, 1969).

Le tableau XXIII montre que les thyroglobulines des diverses espèces de Vertébrés étudiées se répartissent d'après leur composition en acides aminés en trois principaux groupes : les Téléostéens, les Mammifères et les autres Vertébrés. On peut envisager que la composition de la thyroglobuline a varié indépendamment dans les lignées des Actinoptérygiens et des Mammifères tandis qu'elle serait restée plus proche de la composition d'une molécule ancestrale dans les lignées des Chondrichthyens et des « Choanichthyens » jusqu'aux Reptiles et Oiseaux.

Pour cette protéine, on note que la teneur en His est identique chez le Reptile, les Oiseaux et les Mammifères et que sa teneur en Arg chez les Oiseaux est intermédiaire entre celles des divers « Choanichthyens » et des Mammifères.

Il est intéressant de constater que les teneurs en Arg et Lys varient considérablement mais inversement dans les diverses thyroglobulines étudiées (tabl. XX) car les substitutions de résidus appartenant à un même groupe chimique, dites « conservatrices », sont assez fréquentes (Acher, 1967). Il en résulte que la somme des acides aminés basiques dans les thyroglobulines des diverses espèces étudiées varie peu.

De même, malgré l'existence de variations HS des teneurs en de nombreux acides aminés hydrophobes, le rapport de l'hydrophobicité moyenne/fraction des résidus ionisés (HØ/FCh) est sensiblement constant pour les diverses thyroglobulines étudiées. Pour des molécules aussi volumineuses que la thyroglobuline, il est vraisemblable qu'à des compositions centésimales similaires peuvent correspondre des enchaînements en acides aminés variables, susceptibles de déterminer des conformations assez différentes. Mais il est aussi permis de supposer que les structures primaires des thyroglobulines de Protoptère, de Roussette, de *Xenopus* et du Python, dont les compositions présentent un degré de similitude élevé, sont les plus voisines.

S'il en est ainsi, comment peut-on alors expliquer que les coefficients de sédimentation des thyroglobulines de cet Amphibien et de ce Reptile soient très inférieurs à ceux des thyroglobulines de ces deux Poissons ?

Une influence de la fraction glucidique, qui représente environ 8 % du poids moléculaire de la thyroglobuline ne peut être exclue. L'addition des sucres est séquentielle et postérieure à la synthèse du squelette peptidique de la thyroglobuline. Des variations spécifiques importantes dans la composition de cette copule glucidique seraient susceptibles de modifier la conformation de cette protéine.

D'un autre côté, le fait que le volume spécifique partiel et le rapport HØ/FCh des diverses thyroglobulines étudiées soient très peu différents suggère, d'après Welscher (1969), que la conformation générale de cette protéine est très similaire dans la série des Vertébrés. Dans ce cas, l'hypothèse d'une variation du poids moléculaire peut être envisagée favorablement.

Si le volume spécifique partiel et la forme des thyroglobulines ne varient pas selon l'espèce, on peut calculer (voir Techniques) selon Svedberg et Pedersen (1962) les poids

moléculaires approximatifs des thyroglobulines de Poissons à partir de leurs coefficients de sédimentation et de la masse moléculaire (670 000) de la thyroglobuline de Bœuf (19 S).

Un poids moléculaire de 860 000 est obtenu pour la thyroglobuline de Protoptère et de 600 000 pour celle des Salmonidés. Une détermination du poids moléculaire par ultracentrifugation analytique et équilibre de sédimentation serait nécessaire pour confirmer ou infirmer ces valeurs.

Le problème du nombre et de la taille des chaînes peptidiques constituant les thyroglobulines mammaliennes n'est pas encore résolu (Bornet, 1971). La masse moléculaire des composés obtenus après réduction des ponts disulfures et alkylation de la thyroglobuline est de 165 000 (de Crombrugghe *et al.*, 1966), de 135 000 (Pierce *et al.*, 1965), de 80 000 (Lissitzky *et al.*, 1968) ou de 20 000 et 35 000 (Charlwood *et al.*, 1970).

L'hypothèse d'un poids moléculaire de 860 000 pour la TG_2 du Protoptère conduit à supposer qu'elle serait composée d'un nombre plus élevé de chaînes sous-unitaires.

Certains résultats expérimentaux suggèrent l'existence de deux types, α et β, de sous-unités monomériques dans la thyroglobuline des Mammifères (de Crombrugghe, 1968). Dans le cas où ces sous-unités présenteraient des compositions différentes, il faudrait supposer également que la proportion des sous-unités α et β reste la même dans la thyroglobuline du Protoptère et celles de l'Amphibien et du Reptile, puisque la composition globale est similaire.

Dans l'état actuel des connaissances sur la structure de la thyroglobuline, qui reste un problème essentiel à résoudre, il est prématuré d'émettre des hypothèses plus avancées.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'identité des hormones thyroïdiennes dans les différentes classes des Vertébrés posait le problème de l'homologie des protéines thyroïdiennes, support de l'iodation et au sein desquelles s'effectuent les divers mécanismes impliqués dans la biogenèse hormonale.

Nous avons abordé ce problème par l'étude comparative des caractères physico-chimiques, des processus de biosynthèse et d'iodation des protéines thyroïdiennes chez divers Vertébrés inférieurs et chez les Mammifères. Nos résultats sont en accord avec l'hypothèse de l'homologie de ces protéines dans la série des Vertébrés, tout en mettant en évidence l'existence de certaines différences spécifiques entre elles.

1. L'ultracentrifugation en gradient linéaire de saccharose des extraits thyroïdiens de diverses espèces appartenant à des classes de Vertébrés différentes (Cyclostomes, Chondrichthyens, Osteichthyens, Reptiles) sépare plusieurs fractions protéiques iodées nommées TG_1, TG_2, TG_4 et TG_6 par ordre croissant de coefficient de sédimentation (S) qui correspondent respectivement aux protéines thyroglobuliniques des Mammifères 12 S, 19 S, 27 S et 32 S.

La thyroglobuline $TG_2 \simeq 19$ S représente le principal constituant protéique dans la thyroïde de tous les Vertébrés, à l'exception des Cyclostomes où elle n'est décelée qu'après marquage par l'iode radioactif. Une signification physiologique précise ne peut être attribuée aux proportions relatives de ces diverses fractions protéiques. La présence de la protéine $TG_1 \simeq 12$ S ne constitue pas par elle-même un critère d'intensité du fonctionnement thyroïdien et ne correspond pas nécessairement à un degré d'évolution des espèces, en dépit du fait qu'elle soit le composé majeur dans la thyroïde des Cyclostomes, Vertébrés les plus primitifs. Dans l'état actuel de nos connaissances, cette protéine semble être un produit de dissociation de la thyroglobuline, dont la stabilité peut varier selon l'espèce en fonction de certains caractères structuraux et selon la teneur en iode de cette protéine.

Chez les divers Poissons considérés, espèces dulçaquicoles, marines ou amphihalines, la thyroglobuline et le polymère TG_4 atteignent des taux d'iodation élevés, sensiblement égaux ($\geqslant 1$ %), donc supérieurs à ceux généralement rapportés pour les thyroglobulines mammaliennes.

2. Les processus d'halogénation des protéines thyroïdiennes de différents Poissons ont été analysés par double marquage in vivo des animaux par l'iode radioactif (^{131}I et ^{125}I) et grâce aux dosages de protéines et de ^{127}I réalisés dans chaque fraction des gradients.

Chez toutes les espèces étudiées, l'hétérogénéité d'iodation des molécules constituant la thyroglobuline TG_2 et le polymère TG_4 a pu ainsi être directement mise en évidence.

La cinétique d'iodation des protéines thyroïdiennes montre que l'ensemble des molécules thyroglobuliniques participe au métabolisme de l'iode, mais aussi que la vitesse d'incorporation de l'halogène diminue des protéines de plus faible (TG_2) au plus fort poids moléculaire (TG_4), et dans chaque protéine en fonction du degré d'iodation des molécules.

Nos résultats suggèrent que le processus d'halogénation des protéines thyroïdiennes est continu et progressif depuis leur biosynthèse jusqu'à leur hydrolyse. En accord avec les données obtenues par d'autres auteurs chez les Mammifères, l'halogénation de la thyroglobuline des Poissons est concomitante de modifications de certaines de ses propriétés physico-chimiques, tel que l'accroissement du coefficient de sédimentation et de la stabilité de la structure quaternaire des molécules, testée par addition de dodécyl sulfate de sodium aux extraits thyroïdiens.

Ces résultats nous ont conduite à envisager l'existence de deux groupes de molécules dans la thyroglobuline constituant deux compartiments iodés C_1 et C_2 dans lesquels l'halogène se renouvellerait à des vitesses différentes :

— C_1 correspondrait aux molécules les plus lentes, les moins iodées, plus récemment synthétisées, aisément dissociables par le dodécyl sulfate de sodium, et qui fixent intensément l'iode radioactif.

— C_2 représentant environ 80 % de la thyroglobuline, serait composé des molécules les plus rapides et riches en iode, non dissociables et fixant moins intensément l'halogène.

L'importance relative de ces deux compartiments est susceptible de varier avec l'état d'activité de la glande.

L'évolution en fonction du temps de marquage de la radioactivité spécifique et de la dissociabilité des molécules de thyroglobuline suggère que le compartiment C_1 est le précurseur, au moins pro parte, du compartiment C_2. La vitesse de renouvellement de l'iode dans le polymère TG_4 est également hétérogène et incite à penser que cette protéine résulte de la polymérisation de molécules originaires de C_1 et C_2.

Ces résultats s'insèrent bien dans le cadre d'une hétérogénéité fonctionnelle de la glande thyroïde qui a été mise en évidence chez le Rat par des études autoradiographiques et par des cinétiques de sécrétion de l'iode thyroïdien. Une partie des molécules de thyroglobuline néosynthétisées, de RAS élevée (C_1), pourraient être hydrolysées rapidement et à proximité du ou des sites d'iodation, tandis que les autres continueraient à s'halogéner progressivement et s'accumuleraient dans la lumière colloïdale ; elles pourraient ainsi atteindre des taux d'iodation élevés et une structure quaternaire plus stable (C_2), avant d'être hydrolysées à leur tour et de libérer les hormones thyroïdiennes, après un temps plus ou moins long de stockage dans les vésicules colloïdes.

3. Un autre aspect fondamental de l'activité thyroïdienne, la biosynthèse des protéines thyroïdiennes, a été étudié in vitro chez divers Vertébrés inférieurs. Chez ces derniers, comme chez les Mammifères, la synthèse de ces protéines est indépendante de l'iodation.

Le spectre d'ultracentrifugation de ces protéines, marquées par la tyrosine tritiée (3-8 S, $\simeq$ 12 S, $\simeq$ 19 S) est similaire de celui des protéines synthétisées dans la thyroïde des Mammifères. Pour chaque espèce de Poisson étudiée, la thyroglobuline néosynthétisée, non iodée, présente un coefficient de sédimentation inférieur de 1 S environ à celui de la thyroglobuline native correspondante.

La température jouant un rôle important sur l'activité thyroïdienne chez les Poïkilothermes, l'influence de la température d'incubation sur la biosynthèse de la thyroglobuline a été étudiée.

L'accroissement de la température d'incubation exerce une action positive sur les processus de biosynthèse de la thyroglobuline jusqu'à une température limite supérieure, qui varie selon les espèces considérées.

La capacité de biosynthèse protéique des thyroïdes des Poissons et des Mammifères varie différemment en fonction de la température. D'une part, une synthèse de thyroglobuline est mise en évidence à 5°C après 6 h d'incubation chez les divers Poissons étudiés, mais ne l'est pas chez les Mammifères même après 48 h d'incubation. D'autre part, les températures optimales de synthèse de la thyroglobuline chez les Téléostéens sont bien inférieures à 38°C, température de biogenèse de cette protéine dans la thyroïde des Mammifères, et semblent varier en relation avec la zone de tolérance thermique des espèces.

Avec toutes les réserves qui s'imposent lorsqu'il s'agit de transposer les données obtenues in vitro aux phénomènes in vivo, on peut émettre l'hypothèse que les processus enzymatiques, impliqués dans la biogenèse de la thyroglobuline, présentent une certaine adaptation thermique selon les espèces et leurs biotopes.

4. Si l'organisation moléculaire des iodoprotéines thyroïdiennes est similaire dans la série des Vertébrés, diverses données montrent que ces protéines homologues ne sont pas identiques et présentent une certaine spécificité zoologique.

Des différences interspécifiques significatives sont mises en évidence entre les coefficients de sédimentation des protéines thyroïdiennes des divers Poissons étudiés. Les valeurs extrêmes obtenues pour la thyroglobuline sont de 17,7 S (Truite, Saumon) et de 22,5 S (Protoptère).

Des variations de la conformation en relation avec le degré d'iodation ou la structure de la thyroglobuline pouvaient être envisagées pour interpréter ces différences interspécifiques de coefficient de sédimentation.

Nous avons montré que ces dernières sont indépendantes du taux d'iodation des thyroglobulines.

D'un autre côté, l'analyse de la composition en acides aminés des thyroglobulines de Poissons (Saumon, Truite, Anguille, Protoptère, Roussette) et d'un Reptile (Python) permet de constater que les teneurs en de nombreux acides aminés varient significativement selon l'espèce. Nos données ont été comparées à celles obtenues par divers auteurs, à partir de thyroglobulines d'autres classes de Vertébrés (Amphibiens, Oiseaux et Mammifères) et dont les coefficients de sédimentation sont voisins de 19 S.

Il apparaît alors que les différences interspécifiques de coefficient de sédimentation ne sont pas liées à l'importance des variations de la composition globale en acides aminés de ces protéines.

En revanche, certaines analogies entre les compositions en acides aminés des différentes thyroglobulines considérées sont observées et semblent être en rapport avec les relations phylétiques des espèces étudiées.

Un grand degré de similitude est observé entre les thyroglobulines des trois Téléostéens étudiés et entre les thyroglobulines de la Roussette et du Protoptère. Les compositions de ces dernières sont proches de celles des Amphibiens, Reptiles et Oiseaux, mais diffèrent nettement de celles des Téléostéens et des Mammifères.

Ainsi, la composition de la thyroglobuline aurait varié indépendamment dans les lignées des Actinoptérygiens (Saumon, Truite, Anguille) et des Mammifères, tandis qu'elle

serait restée plus proche de celle d'une thyroglobuline hypothétique ancestrale chez les Chondrichthyens (Roussette), les Dipneustes (Protoptère), les Amphibiens, les Reptiles et les Oiseaux.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes très vifs remerciements :
à Monsieur le Professeur Fontaine, Membre de l'Institut, qui m'a proposé le sujet de cette thèse ;
à Messieurs les Professeurs Jost, Jard et Nunez qui m'ont fait le grand honneur de faire partie du jury ;
à Monsieur Lachiver, Maître de Recherche au CNRS, qui m'a initiée à la recherche et m'a guidée jusqu'au terme de ce travail ; qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance ;
à Mademoiselle Boulu qui a fait preuve d'une grande compétence technique et d'un dévouement constant.
Je dédie ce travail, en témoignage d'affection et de gratitude à mes parents.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACHER, R., 1967. — Évolution de la structure des protéines. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49** : 609-631.

ADANT, M., et P. SPEHL, 1934. — La spécificité immunologique des thyroglobulines. *C. r. Séanc. Soc. biol.*, **117** : 230-231.

ALLEN, E., et R. J. SCHWETT, 1962. — Synthesis of hemoglobin in a cell-free system. I. Properties of the complete system. *J. biol. Chem.*, **237** : 760-767.

ALOJ, S., G. SALVATORE et J. ROCHE, 1967. — Isolation and properties of a native subunit of Lamprey thyroglobulin. *J. biol. Chem.*, **242** : 3810-3814.

ANDREOLI, M., L. SENA, H. EDELHOCH et G. SALVATORE, 1969. — The non covalent subunit structure of human thyroglobulin. *Archs Biochem. Biophys.*, **134** : 242-248.

BACHRACH, E., et N. GUILLOT, 1941. — Influence des conditions ioniques sur l'optimum thermique des fonctions physiologiques. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **212** : 929-932.

BARRINGTON, E. J. W., 1959. — Some endocrinological aspects of the Protochordata. *In* : A. GORBMAN, Comparative endocrinology, Ed. J. Wiley and sons, Inc. New York : 250-265.

BARRINGTON, E. J. W., et A. J. MATTY, 1954. — Seasonal variation in the thyroid gland of the minnow *Phoxinus phoxinus* L. with some observations on the effect of temperature. *Proc. zool. Soc., Lond.*, **124** : 89-95.

BEHRISCH, H. W., 1969. — Temperature and regulation of enzyme activity in Poikilotherms. Fructose diphosphatase from migrating salmon. *Biochem. J.*, **115** : 687-696.

BERG, O., A. GORBMAN et H. KOBAYASHI, 1959. — The thyroid hormones in Invertebrates and lower Vertebrates. *In* : A. GORBMAN, Comparative endocrinology, Ed. J. Wiley and sons, Inc. New York : 302-319.

BORNET H., 1971. — Nouvelles méthodes d'étude de la thyroglobuline en milieu dodecyl sulfate. Colloque : Méthodologie expérimentale en physiologie et en physiopathologie thyroïdiennes. Mornex R. et Nunez J., Lyon : 169-183.

BOUCHILLOUX, S., M. ROLLAND, J. TORRESANI, M. ROQUES et S. LISSITZKY, 1964. — Microhétérogénéité de la thyroglobuline. Purification par chromatographie sur diethylaminoethyl cellulose. *Biochim. biophys. Acta*, **93** : 15-30.

BRADLEY, A. S., et S., L. WISSIG, 1966. — The anatomy of secretion in the follicular cell of the thyroid gland. III. The acute effect in vivo of thyrotropic hormone on amino acid uptake and incorporation into proteins by the mouse thyroid gland. *J. Cell Biol.*, **30** : 433-436.

BRETT, J. R., 1956. — Some principles in the thermal requirements of fishes. *Q. Rev. Biol.*, **31** : 75-87.

BRISSON-MARTIN, A., et F. LACHIVER, 1970. — Variations spécifiques du coefficient de sédimentation de la préthyroglobuline chez quelques Vertébrés inférieurs. *C. r. Séanc. Soc. biol.*, **164** : 1922-1925.

BRISSON-MARTIN, A., et F. LACHIVER, 1972*a*. — Influence de la température d'incubation sur la biosynthèse de la thyroglobuline dans la thyroïde de divers Poissons. 6e Congr. Europ. Endocrinologie comparée, Montpellier, 1971. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **18** : 578.

BRISSON-MARTIN, A., et F. LACHIVER, 1972*b*. — Biosynthèse in vitro de la thyroglobuline chez le Saumon atlantique adulte (*Salmo salar* L.). Influence de la température d'incubation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **19** : 201-211.

BROWN, H., F. SANGER et R. KITAI, 1955. — The structure of pig and sheep insulins. *Biochem. J.*, **60** : 556-565.

CAMPAGNE, R. N., et M. GRÜBER, 1962. — Amino acid and energy requirements of protein synthesis in rat pancreatic tissue in vitro. *Biochim. biophys. Acta*, **55** : 353-360.

Carlomagno, M. S., A. R. Bianco, S. M. Aloj et G. Vecchio, 1970. — Studies of some immunological properties of thyroid iodoprotéins. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **39** : 391-402.

Cavalieri, R. R., et G. L. Searle, 1967*a*. — Biosynthesis of thyroglobulin and subunits in the rat thyroid gland in vivo. *Biochem. J.*, **102** : 25 c.

Cavalieri, R. R., et G. L. Searle, 1967*b*. — Early effects of thyrotropin on biosynthesis of thyroglobulin in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **126** : 459-462.

Cavalieri, R. R., G. L. Searle et L. L. Rosenberg, 1970. — Studies of thyroglobulin of hypophysectomized rats. II. Nature of thyroidal iodoprotein after hypophysectomy of rats previously depleted of colloid by propylthiouracil. *Endocrinology*, **86** : 10-17.

Ceriani, R., C. Thomas-Morvan et B. Nataf, 1971. — Analyse des protéines solubles thyroïdiennes de faible poids moléculaire (fraction 3-8 S) : études in vivo et en culture organotypique. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **272** : 2089-2092.

Charlwood, P. A., R. Pitt-Rivers et H. L. Schwartz, 1970. — The subunits of thyroglobulin. *Biochem. J.*, **116** : 769-772.

Cheftel, C., et S. Bouchilloux, 1968*a*. — Glycoprotein biosynthesis in sheep thyroid slices incubated with radioactive glucosamine and leucine. I. Polysomes, microsomes and post-microsomal fraction. *Biochim. biophys. Acta*, **170** : 15-28.

Cheftel, C., et S. Bouchilloux, 1968*b*. — Glycoprotein biosynthesis in sheep thyroid slices incubated with radioactive glucosamine and leucine. II. A study of microsomal fractions. *Biochim. biophys. Acta*, **170** : 29-44.

Cohn, E. J., et J. T. Edsall, 1943. — Density and apparent specific volume of proteins. *In* : E. J. Cohn and J. T. Edsall, Proteins, amino acids and peptides, Eds reinhold publishing corporation, New York : 370-381.

Coval, M. L., et A. Taurog, 1967. — Purification and iodinating activity of hog thyroid peroxydase. *J. biol. Chem.*, **242** : 5510-5523.

Croft, C. J., et R. Pitt-Rivers, 1970. — Radioautographic studies of the initial site of formation of proteins-bound iodine in the rat thyroid gland. *Biochem. J.*, **118** : 311-314.

Crombrugghe, B. de, 1968. — Propriétés moléculaires de la thyroglobuline normale et pathologique. Thèse de Sciences, librairie universitaire de Louvain, D., 0109, 20.

Crombrugghe, B. de, R. Pitt-Rivers et H. Edelhoch, 1966. — The properties of thyroglobulin. XI. The reduction of the disulfide bonds. *J. biol. Chem.*, **241** : 2766-2773.

Crombrugghe, B. de, H. Edelhoch, C. Beckers et M. de Visscher, 1967. — Thyroglobulin from human goiters : Effects of iodination on sedimentation and iodoamino acids synthesis. *J. biol. Chem.*, **242** : 5681-5685.

Derrien, Y., R. Michel et J. Roche, 1948. — Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure. *Biochim. biophys. Acta*, **2** : 454-470.

Dodd, J. M., et A. J. Matty, 1964. — Comparative aspects of thyroid function. *In* : R. Pitt-Rivers and W. R. Trotter, The thyroid gland, Eds Butterworth, London and Washington, D.C. : 303-356.

Drury, D. E., et J. G. Eales, 1968. — The influence of temperature on histological and radiochemical measurements of thyroid activity in the eastern brook trout, *Salvelinus fontinalis* Mitchell. *Can. J. Zool.*, **46** : 1-9.

Eales, J. G., 1964. — The influence of temperature on thyroid histology and radioiodine metabolism of yearling steelhead trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.*, **42** : 829-841.

— 1965. — Factors influencing seasonal changes in thyroid activity in juvenile steelhead trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.*, **43** : 719-729.

Edelhoch, H., 1960. — The properties of thyrogobulin. I. The effects of alkali. *J. biol. Chem.*, **235**: 1326-1334.

— 1965. — The structure of thyroglobulin and its role in iodination. *Recent Prog. Horm. Res.*, **21** : 1-31.

EDELHOCH, H., et R. E. LIPPOLDT, 1962. — The properties of thyroglobulin IX. The molecular properties of iodinated thyroglobulin. *J. biol. Chem.*, **237** : 2788-2794.

EDELHOCH, H., et J. E. RALL, 1964. — The proteins and enzymes of the thyroid. *In* : R. PITT-RIVERS and W. R. TROTTER, The thyroid gland, Eds Butterworth, London and Washington, D.C. : 113-130.

EDELHOCH, H., M. S. CARLOMAGNO et G. SALVATORE, 1969. — Iodine and the structure of thyroglobulin. *Archs Biochem. Biophys.*, **134** : 264-265.

EGGERT, B., 1938. — Morphologie und histophysiologie der Normalen Schilddrüse. Leipzig, Barth.

EKHOLM, R., et U. STRANDBERG, 1966. — Studies on protein synthesis in the guinea-pig thyroid. I. In vivo incorporation of ^{3}H-leucine into the proteins of subcellular fractions. *J. Ultrastruct. Res.*, **16** : 181-196.

EKHOLM, R., et U. STRANDBERG, 1967*a*. — Thyroglobulin biosynthesis in the rat thyroid. *J. Ultrastruct. Res.*, **20** : 103-110.

EKHOLM, R., et U. STRANDBERG, 1967*b*. — Studies on the protein synthesis in the guinea-pig thyroid. II. In vivo labeling of thyroglobulin with ^{3}H-leucine. *J. Ultrastruct. Res.*, **17** : 184-194.

FIELD, J. B., C. A. ELVEHJEM et CHANCEY JUDAY, 1943. — A study of the blood constituents of carp and trout. *J. biol. Chem.*, **148** : 261-269.

FLORKIN, M., 1962. — Isologie, homologie, analogie et convergence en biochimie comparée. *Bull. Acad. r. Belg. Cl. Sci.*, **48** : 819-824.

FOISSAC, L., 1964. — Détermination automatique de l'iode protéique du sérum. Symposium Compagnie Technicon France, F 123 : 1-6.

FONTAINE, M., 1971. — Quelques considérations sur les Poissons migrateurs et leur pisciculture. *La pisciculture française*, **28** : 31-36.

FONTAINE, M., A. GORBMAN, J. LELOUP et M. OLIVEREAU, 1952. — La glande thyroïde de la Lamproie marine (*Petromyzon marinus marinus* L.) lors de sa montée reproductrice. *Annls Endocr.*, **13** : 55-57.

FONTAINE, M., J. LELOUP et M. OLIVEREAU, 1953*a*. — De la nécessité de l'emploi des techniques convergentes pour l'étude de la fonction thyroïdienne chez les Poissons. Congr. Internat. Physiol., Montréal : 356-357.

FONTAINE, M., J. LELOUP et M. OLIVEREAU, 1953*b*. — Étude histologique et biochimique de la glande thyroïde de l'Anguille hypophysectomisée. *C. R. Séanc. Soc. biol.*, **147** : 255-257.

FONTAINE, M., et Y. A. FONTAINE, 1957. — Influence de l'origine zoologique des substances hypophysaires thyréotropes sur leur activité en fonction de la température. *J. Physiol., Paris*, **49** : 169-173.

FONTAINE, M., et J. LELOUP, 1958. — Sur l'existence d'une « liaison » de l'ion iodure avec certaines protéines du plasma de Saumon adulte (*Salmo salar* L.). *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **247** : 767-770.

FONTAINE, M., et J. LELOUP, 1962. — Le fonctionnement thyroïdien du Saumon adulte (*Salmo salar* L.) à quelques étapes de son cycle migratoire. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2** : 317-322.

FONTAINE, Y. A., et F. LACHIVER, 1964. — Sur l'ioduration in vivo des diverses protéines thyroïdiennes chez le rat normal ou hypophysectomisé. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **259** : 3637-3640.

FORTUNE, P. Y., 1955. — Comparative studies of the thyroid function in Teleosts of tropical and temperate habitats. *J. exp. Biol.*, **32** : 504-513.

FUJITA, H., 1970. — Outline of the fine structural aspects on the synthesis and release of the thyroid hormone. *Gunma Symp. Endocr.*, **7** : 49-63.

— 1972. — Morphological aspects on the site of iodination of thyroglobulin in the thyroid gland. *Archs hist. Japon*, **34** : 109-141.

Gavaret, J. M., M. F. Julien, M. Cadot, J. Nunez et L. Chevillard, 1971. — Relation entre teneur en iode et propriétés de thyroglobulines obtenues par la méthode d'équilibrage isotopique. *Biochim. biophys. Acta*, **236** : 706-717.

Gorbman, A., 1969. — Thyroid function and its control in fishes. *In* : W. S. Hoar and D. J. Randall, Fish physiology, Eds Acad. Press, New York and London, 1969 : 241-274.

Gorbman, A., et O. Berg, 1955. — Thyroid function in the fishes *fundulus heteroclitus*, *F. majalis* and *F. diaphanus*. *Endocrinology*, **56** : 86-92.

Grant, P. T., et K. B. M. Reid, 1968. — Isolation and a partial amino acid sequence of insulin from the islet tissue of Cod (*Gadus callarias*). *Biochem. J.*, **106** : 531-541.

Grassé, P. P., 1958. — Classification des Vertébrés. Traité de Zoologie, Masson et Cie éd., XIII, 1er fasc. : 1-10.

Haddad, A., M. D. Smith, A. Herscovics, N. J. Nadler et C. P. Leblond, 1971. — Radioautographic study of in vivo and in vitro incorporation of fucose-^{3}H into thyroglobulin by rat thyroid follicular cells. *J. Cell. Biol.*, **49** : 856-882.

Haibach, H., et I. Kobayashi, 1971. — Heterogeneity of thyroidal iodine turnover in the rat. *Endocrinology*, **89** : 316-318.

Haney, J. F. B., et S. Lissitzky, 1963. — A study of the dialysable iodocompounds of rat thyroid gland. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **3** : 139-148.

Hektoen, L., H. Fox et K. Schulhof, 1927. — Specificness in the precipitin reaction. *J. infect. Dis.*, **40** : 641-646.

Herskovics, A., 1969. — Biosynthesis of thyroglobulin. Incorporation of (I-^{14}C) galactose, (I-^{14}) mannose and (4,5-$^{3}H_2$) leucine into soluble proteins by rat thyroid in vitro. *Biochem. J.*, **112** : 709-719.

Heywood, S. M., 1966. — The regulation of amino acid incorporation into thyroid protein : evidence that thyroxine and iodine inhibit protein synthesis at a ribosomal site. *Biochim. biophys. Acta*, **123** : 188-196.

Hochachka, P. W., et G. N. Somero, 1968. — The adaptation of enzymes to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, **27** : 659-668.

Hoshino, T., et N. Ui, 1970. — Comparative studies on the properties of thyroglobulin from various animal species. *Endocr. Jap.*, **17** : 521-533.

Huet, M., 1970. — *In* : C. H. de Wyngaart, Traité de pisciculture. Éd. de Bruxelles : 1-718.

Ingbar, S. H., B. A. Askonas et T. S. Work, 1959. — Observations concerning the heterogeneity of ovine thyroglobulin. *Endocrinology*, **64** : 110-122.

Inoue, K., et A. Taurog, 1968*a*. — Acute and chronic effects of iodine on thyroid radioiodine metabolism in iodine deficient rats. *Endocrinology*, **83** : 279-290.

Inoue, K., et A. Taurog, 1968*b*. — Sedimentation pattern of soluble protein from thyroids of iodine deficient rats ; acute effects of iodine. *Endocrinology*, **83** : 816-832.

Inoue, K., et A. Taurog, 1968*c*. — Freezing-induced alterations in thyroglobulin from iodine deficient and iodine sufficient rats. *Endocrinology*, **83** : 833-844.

Inoue, K., A. Taurog et M. A. Greer, 1970. — Role of protein synthesis in the utilization of administered iodide by thyroid glands in rats. *Endocrinology*, **87** : 1298-1305.

Ivanova, A. D., 1954. — The thyreotropic effect in hypophysis injections of acipencerines. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **99** : 333-336 (in russian).

Johansson, B. W., 1969. — Temperature dependence of cholinesterase and lactate deshydrogenase in the guinea-pig, hedgehog and codfish. *Acta Physiol. scand.*, **77** : 1-6.

JONCKEER, M. H., et D. M. KARCHER, 1971. — Thyroid albumin. I. Isolation and characterization. *J. clin. Endocr. Métab.*, **32** : 7-17.

LACHIVER, F., 1969. — Seasonal hormonal effect of states of depressed metabolism. *In* : X. J. MUSACCHIA and J. F. SAUNDERS, Depressed metabolism, Eds Amer. Elsevier, Inc. New York : 199-230.

LACHIVER, F., et Y. A. FONTAINE, 1964. — Sur l'ioduration in vivo des diverses protéines thyroïdiennes chez le Lérot (*Eliomys quercinus* L.) en hibernation prolongée. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **259** : 3851-3854.

LACHIVER, F., Y. A. FONTAINE et A. MARTIN, 1965. — The iodination in vivo of thyroid proteins in various Vertebrates. *In* : C. CASSANO and M. ANDREOLI, Current topics in thyroid research, Eds New York Acad. Press : 182-192.

LACHIVER, F., A. MARTIN et M. FONTAINE, 1966. — Iodation in vivo des protéines thyroïdiennes chez quelques Vertébrés inférieurs. *Gunma Symp. Endocr.*, **3** : 109-120.

LACHIVER, F., et A. MARTIN, 1967. — Biosynthèse et iodation in vitro des protéines thyroïdiennes chez quelques Poissons. Abstract 1er Congrès Ass. Européenne de recherches sur la glande thyroïde, Louvain.

LACHIVER, F., et A. MARTIN, 1968. — Taux d'iodation de la thyroglobuline chez le Saumon atlantique (*Salmo salar* L.). Abstract 2e Congrès Ass. Européenne de recherches sur la glande thyroïde, Marseille.

LACHIVER, F., Y. A. FONTAINE, E. LOPEZ et A. MARTIN, 1969. — Hypoactivité de la glande thyroïde chez les lapins immunisés contre l'hormone thyréotrope de bœuf. *Annls Endocr.*, **30** : 267-280.

LEBLOND, C. P., et J. GROSS, 1948. — Thyroglobulin formation in the thyroid follicle visualized by the « coated autoradiograph » technique. *Endocrinology*, **43** : 306-324.

LELOUP, J., 1958. — Influence de la température sur le fonctionnement thyroïdien de l'Anguille normale. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **247** : 2454-2456.

— 1964*a*. — Biochimie comparée des hormones thyroïdiennes. Colloque sur la thyroïde. (Rio de Janeiro, 1961). *In* : C. CHAGAS et L. C. LOBO, Ed. Colloquio sobre a tiroide : 47-80.

— 1964*b*. — Répartition zoologique de la protéine plasmatique de liaison des iodures chez les Poissons. *J. Physiol., Paris*, **56** : 593-594.

— 1970. — Les mécanismes de régulation de l'iodurémie et leur contrôle endocrinien chez les Téléostéens en eau douce. Thèse de Sciences, Paris, Éditions du Muséum, 108 p.

LELOUP, J., et M. FONTAINE, 1960. — Iodine metabolism in lower Vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **86** : 316-353.

LICHT, P., 1967. — Thermal adaptation in the enzymes of lizards in relation to preferred body temperatures. *In* : C. LADD PROSSER, Molecular mechanisms of temperature adaptation, Ed. Am. Ass. Adv. Sci., Washington, D.C. : 131-145.

— 1969. — Thermal adjustements in cardiac and skeletal muscles of lizards. *Z. vergl. Physiol.*, **65** : 1-14.

LISSITZTY, S., 1964. — Biosynthèse des hormones thyroïdiennes. Colloque sur les hormones thyroïdiennes. (Paris, 1963). *In* : Exposés annuels de Biochimie médicale, MASSON et Cie éd. : 1-19.

LISSITZKY, S., M. ROQUES, J. TORRESANI, C. SIMON et S. BOUCHILLOUX, 1964. — Iodination and biosynthesis of rat thyroglobulin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **16** : 249-253.

LISSITZKY, S., M. ROQUES, J. TORRESANI et C. SIMON, 1965. — Biosynthèse, iodation et hétérogénéité de la thyroglobuline. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **47** : 1999-2037.

LISSITZKY, S., C. SIMON, M. ROQUES et J. TORRESANI, 1966. — Thyroglobulin maturation in rat and nomenclature of thyroglobulin-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23** : 429-435.

Lissitzky, S., M. Rolland, J. Reynaud, J. Savary et S. Lasry, 1968. — Structure sous-unitaire de la thyroglobuline de mouton. *Eur. J. Biochem.*, **4** : 464-471.

Lockwood, A. P. M., 1961. — Ringer solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, **2** : 241-289.

Loewenstein, J. E., et S. M. Wollman, 1967. — Distribution of organic ^{125}I and ^{127}I in the rat thyroid gland during equilibrium labeling as determined by autoradiography. *Endocrinology*, **81** : 1074-1085.

Loewenstein, J. E., et S. H. Wollman, 1970. — Mechanisms for abnormally slow release of some thyroid radiodine. An autoradiography study. *Endocrinology*, **87** : 143-150.

Lowry, H. O., N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall, 1951. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193** : 265-275.

Lubin, M., 1964. — Intracellular potassium and control of protein synthesis. Federation Proc., **23** : 994-1001.

Maloof, F., G. Sato et M. Soodak, 1964. — Dissociation of iodination from protein synthesis in the rat thyroid. *Médecine*, **43** : 375-378.

Marchelidon, J., A. Brisson-Martin et F. Lachiver, 1972. — Composition en acides aminés de la thyroglobuline de divers Poissons. 6e Congrès Europ. d'Endocrinologie comparée, Montpellier, 1971. *Gen. Comp. Endocr.*, **18** : 601.

Martin, A., et F. Lachiver, 1968. — Biosynthèse in vitro des protéines thyroïdiennes chez le Saumon atlantique (*Salmo salar* L.). Abstract 2e Congrès Ass. Européenne de recherches sur la glande thyroïde, Marseille.

Martin, R. G., et B. M. Ames, 1961. — A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : application to protein mixtures. *J. biol. Chem.*, **236** : 1372-1379.

Mauchamp, J., et J. Nunez, 1968. — Synthèse et iodation de la thyroglobuline chez l'Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) et le têtard prémétamorphique (*Rana catesbeiana*). *Gen. Comp. Endocr.*, **10** : 47-55.

Melmon, K. L., J. V. Hodge et A. Sjoerdsma, 1964. — Effects of thyroxine T_4 and thyrotrophin (TSH) on free tyrosine content of rat thyroid. Fed. Proc., **23** : 434.

Moore, S., D. H. Spackman et W. H. Stein, 1958. — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analyt. Chem.*, **30** : 1185-1190.

Morais, R., et I. H. Goldberg, 1967. — Cell-free synthesis of thyroglobulin. *Biochemistry*, **6** : 2539-2545.

Morris, D., et M. W. Smith, 1967. — Protein synthesis in the intestine of goldfish acclimatized to different temperatures. *Biochem. J.*, **102** : 648-653.

Nadler, N. J., et C. P. Leblond, 1955. — The site and rate of formation of thyroid hormone. *Brookhaven Symp. Biol.*, **7** : 40-60.

Nadler, N. J., B. A. Young, C. P. Leblond et B. Mitmaker, 1964. — Elaboration of thyroglobulin in the thyroid follicle. *Endocrinology*, **74** : 333-354.

Nayer, P. de, et M. de Visscher, 1969. — Thyroglobulin synthesis in a thyroid polyribosomal cell-free system. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **36** : 639-646.

Nayer, P. de, et M. de Visscher, 1970. — Covalent association of thyroglobulin subunits in a thyroid polyribosomal cell-free system. *F.E.B.S. Letters*, **8** : 137-139.

Neuman, P. A., et R. E. Humbel, 1969. — Isolation of a single component of fish insulin from a bonito-tuna-swordfish insuline mixture and its complete amino acid sequence. *Int. J. protein Res.*, **1** : 125-140.

Neuman, P. A., M. Koldenhof et R. E. Humbel, 1969. — Amino acid sequence of insulin from the anglar fish (*Lophius piscatorius*). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350** : 1286-1288.

Neville, M. C., 1971. — The effect of temperature on amino acid entry into frog muscle. Abstract Hibernation Hypothermia IV Symposium Aspen Colorado.

NUNEZ, J., 1968. — Action hormonale sélective sur la synthèse de protéines spécifiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **50** : 2835-2899.

NUNEZ, J., et C. JACQUEMIN, 1961. — Comptage de radiochromatogrammes par scintillation liquide. *J. Chromat.*, **5** : 271-272.

NUNEZ, J., C. JACQUEMIN et J. ROCHE, 1962. — Préparation de phénols tritiés I. Hydrogénolyse catalytique des dérivés iodés de la thyronine, de la tyrosine et de l'oestradiol. *Inter. J. appl. Radiat. Isotopes*, **13** : 573-581.

NUNEZ, J., J. MAUCHAMP et J. ROCHE, 1964. — Biosynthèse in vitro d'hormones marquées par ^{3}H et ^{125}I dans des coupes de corps thyroïde. I. Propriétés des coupes en survie. *Biochim. biophys. Acta*, **86** : 361-371.

NUNEZ, J., J. MAUCHAMP, V. MACCHIA et J. ROCHE, 1965*a*. — Biosynthèse in vitro d'une préthyroglobuline non iodée dans le corps thyroïde. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **260** : 331-333.

NUNEZ, J., J. MAUCHAMP, V. MACCHIA et J. ROCHE, 1965*b*. — Biosynthèse in vitro d'hormones doublement marquées dans des coupes de corps thyroïde. II. Biosynthèse d'une préthyroglobuline non iodée. *Biochim. biophys. Acta*, **107** : 247-256.

NUNEZ, J., J. MAUCHAMP, J. POMMIER, T. CIRKOVIC et J. ROCHE, 1966. — Biogenèse de la thyroglobuline : les transitions d'halogénation. *Biochim. biophys. Acta*, **127** : 112-127.

NUNEZ, J., M. PAVLOVIC-HOURNAC, L. RAPPAPORT et J. ROCHE, 1967*a*. — Synthèse in vivo et in vitro de la thyroglobuline et de ses précurseurs chez le rat. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49** : 1295-1308.

NUNEZ, J., J. MAUCHAMP, A. JERUSALMI et J. ROCHE, 1967*b*. — Synthèse acellulaire de la thyroglobuline et site d'iodation. *Biochim. biophys. Acta*, **145** : 127-137.

OLIVEREAU, M., 1954. — Hypophyse et glande thyroïde chez les Poissons. Étude histophysiologique de quelques corrélations endocriniennes, en particulier chez *Salmo salar* L. *Annls Inst. Océanogr., Monaco*, **29** : 95-296.

— 1955*a*. — Influence de la température sur le fonctionnement thyroïdien de la truite étudié à l'aide de l'iode radioactif. *C. r. Séanc. Soc. biol.*, **149** : 536-539.

— 1955*b*. — Influence de la température sur l'histologie thyroïdienne de divers Téléostéens. *Bull. Soc. zool., Fr.*, **80** : 43-52.

— 1955*c*. — Température et fonctionnement thyroïdien chez les Poissons. *J. Physiol., Paris*, **47** : 256-258.

OTTEN, J., M. JONCKEER et J. DUMONT, 1971. — Thyroid albumin. II. In vitro synthesis of a thyroid albumin by normal human thyroid tissue. *J. clin. Endocr.*, **32** : 18-26.

PAVLOVIC-HOURNAC, M., L. RAPPAPORT et J. NUNEZ, 1967. — Action de la TSH sur la synthèse de la thyroglobuline. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49** : 1309-1315.

PERLMAN, R. L., et H. EDELHOCH, 1967. — The formation of diiodotyrosine in iodinated human serum albumin. *J. biol. Chem.*, **242** : 2416-2422.

PETERSON, R. H., et J. H. ANDERSON, 1969. — Effects of temperature on brain tissue oxygen consumption in Salmonid fishes. *Can. J. Zool.*, **47** : 1345-1353.

PHILLIPS, A. M., H. A. PODOLIAK, D. R. BROCKWAY et G. C. BALZER, 1957. — The nutrition of trout. Cortland hatchery Report n° 25. *Fishery Res. Mgmt Div. Bull.*, **20**, 61 p.

PICKFORD, G. E., 1959. — The nature and physiology of the pituitary hormones of fishes. *In* : A. GORBMAN, Ed. Wiley J. and sons., Inc. New York : 404-420.

PIERCE, J. G., A. B. RAWITCH, D. M. BROWN et P. G. STANLEY, 1965. — Human thyroglobulin : studies on the native and S-carboxymethylated protein. *Biochim. biophys. Acta*, **111** : 247-257.

PIEZ, K. A., et L. MORRIS, 1960. — Modified procedure for the automatic analysis of amino acids. *Analyt. Biochem.*, **1** : 187-201.

Pitt-Rivers, R., 1963. — Heterogeneity of rat thyroglobulin labelled with ^{131}I in vivo. *Biochem. J.*, **87** : 340-343.

Pitt-Rivers, R., et R. R. Cavalieri, 1963. — The free iodotyrosines of the rat thyroid gland. *Biochem. J.*, **86** : 86-92.

Pitt-Rivers, R., et R. R. Cavalieri, 1964. — Thyroid hormone biosynthesis. *In* : R. Pitt-Rivers and W. R., Trotter, The thyroid gland, Eds Butterworth, London and Washington, D.C. : 87-112.

Pitt-Rivers, R., J. S. F. Niven et M. R. Young, 1964. — Localization of protein-bound radioactive iodine in rat thyroid glands labeled with ^{131}I or ^{125}I. *Biochem. J.*, **90** : 205-208.

Ragupathy, E., W. Tong et I. L. Chaikoff, 1963. — Amino acid ^{14}C incorporation into protein by thyroid gland slices : effects of thyrotropic hormone injections and of hypophysectomy. *Endocrinology*, **72** : 620-625.

Rall, J. E., J. Billstad, H. Edelhoch, R. Lippoldt et G. Salvatore, 1971. — The relationship between 19 S and 27 S thyroidal iodoproteins. Abstract 4th meeting of the european thyroid association, Berne, n° 28 : 17.

Rappaport, L., 1970. — Régulation de la synthèse protéique dans la glande thyroïde. Thèse de Sciences, Paris, n° enregistrement CNRS A.O. 4854, 93 p.

Robbins, J., 1961. — A chromatographic study of beef thyroglobulin on diethylaminoethyl cellulose. *C. r. Trav. Carlsberg*, **32** : 215-239.

— 1963. — Thyroglobulin fractionation on diethylaminoethyl cellulose columns. *J. biol. Chem.*, **238** : 182-188.

Robbins, J., et J. E. Rall, 1960. — Proteins associated with the thyroid hormones. *Phys. Rev.*, **40** : 415-489.

Robbins, J., G. Salvatore, G. Vecchio et N. Ui, 1966. — Thyroglobulin and 27 S iodoprotein. Iodination and ultracentrifugal heterogeneity. *Biochim. biophys. Acta*, **127** : 101-111.

Roche, J., 1950. — Iodoprotéines naturelles et protéines artificiellement iodées. Estratto dai rendi conti dell' istituto superiore di sanita, Rome, **13** : 938-957.

Roche, J., et R. Michel, 1955. — Acides aminés iodés et iodoprotéines. *Fortschr. Chem. org. NatStoffe*, **12** : 349-405.

Roche, J., J. Nunez et M. Gruson, 1960. — Sur l'hétérogénéité de la thyroglobuline. *C. r. Séanc. Soc. biol.*, **154** : 2194-2201.

Roche, J., M. Fontaine et J. Leloup, 1963. — Halides. *In* : M. Florkin and H. S. Mason, Comparative Biochemistry, Eds Acad. Press, New York and London, V : 493-547.

Roche, J., G. Salvatore, L. Sena, J. Aloj et I. Covelli, 1968. — Thyroid iodoproteins in Vertebrates : ultracentrifugal pattern and iodination rate. *Comp. Biochem. Physiol.*, **27** : 67-82.

Rolland, M., J. Bismuth, J. Fondarai et S. Lizzitzky, 1966. — Composition en acides aminés de la thyroglobuline de différentes espèces animales. *Acta Endocr.*, **53** : 286-296.

Rolland, M., R. Aquaron et S. Lissitzky, 1970. — Thyroglobulin iodoamino acids estimation after digestion with pronase and leucyl-amino peptidase. *Analyt. Biochem.*, **33** : 307-317.

Roques, M., J. Torresani et S. Lissitzky, 1969. — Biosynthèse de la thyroglobuline. Précurseurs métaboliques de faible poids moléculaire. *Biochim. biophys. Acta*, **194** : 406-420.

Rosenberg, L. L., G. La Roche et J. M. Ehlert, 1966. — Evidence for heterogeneous turnover of iodine in rat thyroid glands. *Endocrinology*, **79** : 927-934.

Rosenberg, L. L., et R. R. Cavalieri, 1969. — Studies of thyroglobulin of hypophysectomized rats. I : Sensivity to the disaggregating influences of alkali and low ionic strength. *Endocrinology*, **84** : 1322-1329.

Rosenberg, L. L., et R. R. Cavalieri, 1971. — Studies of thyroglobulin of hypophysectomized

rats. III : Evidence for formation and accumulation of thyroglobulin following hypophysectomy. Relationship of iodine content of thyroglobulin and sensivity to disaggregation in alkali. *Endocrinology*, **89** : 439-444.

RYLE, A. P., F. SANGER, L. F. SMITH et R. KITAI, 1955. — The disulfide bonds of insulin. *Biochem. J.*, **60** : 541-556.

SALVATORE, G., 1969. — Thyroid hormone biosynthesis in Agnatha and Protochordata. *Gen. Comp. Endocr.*, suppl. 2 : 535-552.

SALVATORE, G., M. SALVATORE, H. J. CAHMANN et J. ROBBINS, 1964. — Separation thyroidal iodoproteins and purification of thyroglobulin by gel filtration and density gradient centrifugation. *J. biol. Chem.*, **239** : 3267-3274.

SALVATORE, G., G. VECCHIO, M. SALVATORE, H. J. CAHMANN et J. ROBBINS, 1965*a*. — 27 S thyroid iodoprotein. Isolation and properties. *J. biol. Chem.*, **240** : 2935-2943.

SALVATORE, G., L. SENA, I. COVELLI et M. SALVATORE, 1965*b*. — Les iodoprotéines thyroïdiennes 12 S, 19 S et 27 S chez divers Mammifères et leur signification physiologique. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, **260** : 6227-6229.

SALVATORE, G., L. SENA, E. VISCIDI et M. SALVATORE, 1965*c*. — The thyroid iodoproteins 12 S, 19 S and 27 S in various animal species and their physiological significance. *In* : C. CASSANO and M. ANDREOLI, Currents topics in thyroid research, Eds New York Acad. Press. : 193-206.

SALVATORE, G., S. ALOJ, M. SALVATORE et H. EDELHOCH, 1967. — Hybridization of half molecules of guinea-pig thyroglobulin. *J. biol. Chem.*, **242** : 5002-5007.

SCHNEIDER, A. B., H. BORNET et H. EDELHOCH, 1970. — Properties of thyroglobulin. XX : The biosynthesis of thyroglobulin. The effect of temperature on subunit species. *J. biol. Chem.*, **245** : 2672-2678.

SCHNEIDER, A. B., H. BORNET et H. EDELHOCH, 1971. — The effects of low temperature on the conformation of thyroglobulin. *J. biol. Chem.*, **246** : 2835-2841.

SCHNEIDER, A. B., et H. EDELHOCH, 1971*a*. — Determination of the iodine distribution in thyroglobulin by equilibrium density centrifugation in RbCl. Abstract 4th meeting of the european thyroid association, Berne, n° 46 : 28.

SCHNEIDER, A. B., et H. EDELHOCH, 1971*b*. — Equilibrium density centrifugation of thyroglobulin in RbCl. Effect of iodine. *J. biol. Chem.*, **246** : 6592-6598.

SCHNEIDER, P. B., 1964. — Thyroidal iodine heterogeneity : « last come, first served » system of iodine turnover. *Endocrinology*, **74** : 973-980.

SEED, R. W., et I. H. GOLDBERG, 1963. — Biosynthesis of thyroglobulin : relationship to RNA-template and precursor protein. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **50** : 275-282.

SEED, R. W., et I. H. GOLDBERG, 1965*a*. — Biosynthesis of thyroglobulin. II : Role of subunits, iodination and ribonucleic acid synthesis. *J. biol. Chem.*, **240** : 764-773.

SEED, R. W., et I. H. GOLDBERG, 1965*b*. — Iodination in relation to thyroglobulin maturation and subunit aggregation. *Science*, **149** : 1380-1382.

SELLIN, H. G., et I. H. GOLDBERG, 1965. — Biosynthesis of thyroglobulin. III : Intracellular localization and properties of labeled thyroid proteins. *J. biol. Chem.* : 774-781.

SHULMAN, S., N. R. ROSE et E. WITEBSZY, 1955. — Studies on organ specificity. III. Ultracentrifugal and electrophoretic examinations of thyroid extracts. *J. Immunol.*, **75** : 291-300.

SHULMAN, S., et P. STANLEY, 1961. — Preparation of pure proteins from hog thyroid glands by column chromatography. *Aust. J. biol. Sci.*, **14** : 475-484.

SIMON, C., C. BENABDELJILL et S. LISSITZKY, 1964. — Métabolisme de l'iode de la thyroïde chez le rat. II : Étude du renouvellement de l'iode par double marquage avec les radioisotopes ^{125}I et ^{131}I. *Biochim. biophys. Acta*, **93** : 509-520.

SIMON, C., M. ROQUES, J. TORRESANI et S. LISSITZKY, 1966. — Effect of propythiouracil on the iodination and maturation of rat thyroglobulin. *Acta Endocr.*, Kobenhavn, **53** : 271-275.

SMITH, C. D., et J. G. EALES, 1971. — Influence of acclimation temperature on rate constants for thyroid uptake of iodide by brook trout. *Salvelinus fontinalis* Mitch. *Can. J. Zool.*, **49** : 783-786.

SMITH, M. W., 1972. — Temperature adaptation of transport properties in Poikilotherms. *In* : F. E. SOUTH, J. P. HANNON, J. R. WILLIS, E. T. PENGELLEY et N. R. ALPERT, Hibernation-Hypothermia. Eds Elsevier : 219-237.

SOMERO, G. N., 1969. — Enzymatic mechanisms of temperature compensation : immediate and evolutionnary effects of temperature on enzymes of aquatic Poikilotherms. *Am. Nat.*, **103** : 517-530.

— 1972. — Molecular mechanisms of temperature compensation in aquatic poikilotherms. *In* : F. E. SOUTH, J. P. HANNON, J. R. WILLIS, E. T. PENGELLEY et N. R. ALPERT, Hibernation-Hypothermia. Perspectives and challenges, Eds Elsevier : 55-80.

SOMERO, G. N., et P. W. HOCHACHKA, 1968. — The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of the rainbow trout and the antarctic fish *Trematomus bernachii*. *Biochem. J.*, **110** : 395-400.

SPIRO, M. J., 1961. — Evaluation of the homogeneity of several thyroglobulin preparations. *J. biol. Chem.*, **236** : 2901-2907.

SPIRO, M. J., 1970. — Studies on the protein portion of thyroglobulin. Amino acid compositions and terminal amino acids of several thyroglobulins. *J. biol. Chem.*, **245** : 2820-2826.

SPIRO, R. G., et M. J. SPIRO, 1966. — Glycoprotein biosynthesis : studies on thyroglobulin. Characterization of a particulate precursor and radioisotope incorporation by thyroid slices and particle systems. *J. biol. Chem.*, **241** : 1271-1282.

STEIN, O., et J. GROSS, 1964. — Metabolism of ^{131}I in the thyroid gland studied with electron microscopic autoradiography. *Endocrinology*, **75** : 787-798.

STEPHENSON, N. G., 1966. — Effects of temperature on reptilian and other cells. *J. Embryol. exp. Morph.*, **16** : 455-467.

STOKINGER, H. E., et M. HEIDELBERGER, 1937. — A quantitative theory of the precipitin reaction. VI : The reaction between mammalian thyroglobulins and antibodies to homologous and heterologous preparations. *J. exp. Med.*, **66** : 251-272.

SVEDBERG, T., et K. D. PEDERSEN, 1960. — « The ultracentrifuge ». Oxford University Press. Co., New York.

SWIFT, D. R., 1959. — Seasonal variations in the activity of the thyroid gland of yearling brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. exp. Biol.*, **36** : 120-125.

TARUTANI, O., 1971. — Effects of methylthiouracil on thyroglobulin formation. Sialic acid content of iodine-poor thyroglobulin. *Endocr. jap.*, **18** : 403-410.

TARUTANI, O., et N. UI, 1969*a*. — Subunit structure of hog thyroglobulin. Dissociation by treatment with sodium dodecylsulfate. *Biochim. biophys. Acta*, **181** : 116-135.

TARUTANI, O., et N. UI, 1969*b*. — Subunit structure of hog thyroglobulin. Dissociation of non-iodinated and highly iodinated preparations. *Biochem. biophys. Acta*, **181** : 136-145.

TAUROG, A., 1970. — Thyroid peroxydase and thyroxine biosynthesis. *Recent Prog. Horm. Res.*, **26** : 189-247.

TAUROG, A., et E. M. HOWELLS, 1966. — Enzymatic iodination of tyrosine and thyroglobulin with chloroperoxydase. *J. biol. Chem.*, **241** : 1329-1339.

THOMSON, J. A., et I. H. GOLDBERG, 1968. — Biosynthesis of thyroglobulin and its subunits in vivo in the rat thyroid gland. *Endocrinology*, **82** : 805-817.

TISHLER, P. V., et S. H. INGBAR, 1965. — Correlative effects of puromycin on ^{131}I metabolism and amino acid incorporation by calf thyroid slices. *Endocrinology*, **76** : 295-300.

Tixier-Vidal, A., R. Picart, L. Rappaport et J. Nunez, 1969. — Ultrastructure et autoradiographie de cellules thyroïdiennes isolées incubées en présence de ^{125}I. *J. Ultrast. Res.*, **28** : 78-101.

Torresani, J., M. Roques et S. Lissitzky, 1968*a*. — Analyse des protéines iodées thyroïdiennes par électrophorèse en gel de polyacrylamide. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **50** : 1993-2002.

Torresani, J., M. Roques, A. Peyrot et S. Lissitzky, 1968*b*. — Mise en évidence, purification et propriétés d'une iodoalbumine, constituant physiologique de la glande thyroïde de rat. *Acta Endocr.*, **57** : 153-167.

Triantaphyllidis, E., 1958*a*. — Hétérogénéité fonctionnelle de la glande thyroïde. I : Sécrétion de l'iode et hétérogénéité fonctionnelle de la glande. *Archs Sci. physiol.*, **12** : 191-227.

— 1958*b*. — Hétérogénéité fonctionnelle de la glande thyroïde. II : Hétérogénéité fonctionnelle et aspects quantitatifs du métabolisme de l'iode chez l'homme, le rat, le lapin et le cobaye. *Archs Sci. physiol.*, **12** : 245-269.

Ui, N., et O. Tarutani, 1961. — Purification of hog thyroglobulin. *J. Biochem., Tokyo*, **50** : 508-518.

Ui, N., O. Tarutani, Y. Kondo et H. Tamura, 1961. — Chromatographic fractionation of hog thyroglobulin. *Nature*, **191** : 1199-1201.

Valenta, L., M. Roques, J. Torresani et S. Lissitzky, 1968. — Human thyroglobulin physicochemical properties in relation to iodine content. *Biochim. biophys. Acta*, **168** : 507-521.

Valenta, L., et S. Lissitzky, 1971. — Sedimentation and iodination heterogeneity of rat thyroglobulin. Abstract 47th meeting American thyroid association, University Alabama : 28.

Vecchio, G., H. Edelhoch, J. Robbins et B. Weathers, 1966*a*. — Studies on the structure of 27 S thyroid iodoprotein. *Biochemistry*, **5** : 2617-2623.

Vecchio, G., M. Salvatore et G. Salvatore, 1966*b*. — Biosynthesis of thyroglobulin in vivo : formation and polymerization of subunits in the rat and guinea-pig. *Biochem. biophys. Res. commun.*, **25** : 402-408.

Vecchio, G., M. S. Carlomagno et G. M. Claar, 1969. — Biosynthesis of thyroglobulin : partial characterization of a labeled 6 S precursor. *F.E.B.S. Letters*, **4** : 323-326.

Vecchio, G., M. S. Carlomagno et E. Consiglio, 1971. — Identification and characterization of two labeled intermediates in the biosynthesis of rat thyroglobulin. *J. biol. Chem.*, **246** : 6676-6682.

Welscher, H. D., 1969. — Correlations between amino acid sequence and conformation of immunoglobulin light chains. I : Hydrophobicity and fractional charge. *Int. J. Protein Res.*, **1** : 253-265.

Whur, P., A. Herscovics et C. P. Leblond, 1969. — Radioautographic visualization of the incorporation of galactose-^{3}H and mannose-^{3}H by rat thyroids in vitro in relation to the stages of thyroglobulin synthesis. *J. Cell Biol.*, **43** : 289-311.

Willis, J. S., L. S. T. Fang et R. F. Foster, 1972. — The significance and analysis of membrane function in hibernation. *In* : F. E. South, J. P. Hannon, J. R. Willis, E. T. Pengelley et N. R. Alpert, Eds Elsevier : 123-147.

Wolf, K., 1963. — Physiological salines for fresh-water Teleosts. *Progve Fish Cult.*, **25** : 135-140.

Wolf, K., et M. C. Quimby, 1962. — Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, **135** : 1065-1066.

Wollman, S. M., 1965. — Heterogeneity of the thyroid gland. *In* : C. Cassano and M. Andreoli, Current topics in thyroid research, Eds New York Acad. Press : 1-18.

— 1969. — Secretion of thyroid hormones. *In* : Lysosomes in biology and pathology. Reprinted from Dingle J. T. and Fell H., North Holland Publishing Co, Amsterdam : **2** : 483-512.

Wollman, S. M., et I. Wodinsky, 1955. — Localization of protein-bound ^{131}I in the thyroid gland of the mouse. *Endocrinology*, **56** : 9-20.

Yagi, Y., et M. Kodama, 1955. — Études immunochimiques des protéines thyroïdiennes. *C. r. Séanc. Soc. biol.*, **149** : 2282-2284.

Young, J. A., L. J. Hayden et J. M. Shagrin, 1970. — Micropuncture investigation of the effect of altered thyroid function on the cation concentrations and equilibrium potentials in rat thyroid colloid. *Pflügers Arch.*, **321** : 187-196.

Manuscrit déposé le 10 mai 1973.

Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris, 3e sér., juillet-août 1973, n° 177,
Sciences physico-chimiques 2 : 1-108.

Achevé d'imprimer le 30 mars 1974.

IMPRIMERIE NATIONALE

3 564 004 5

Recommandations aux auteurs

Les articles à publier doivent être adressés directement au Secrétariat du *Bulletin du Muséum national d'Histoire naturelle*, 57, rue Cuvier, 75005 Paris. Ils seront accompagnés d'un résumé en une ou plusieurs langues. L'adresse du Laboratoire dans lequel le travail a été effectué figurera sur la première page, en note infrapaginale.

Le *texte* doit être dactylographié à double interligne, avec une marge suffisante, recto seulement. Pas de mots en majuscules, pas de soulignages (à l'exception des noms de genres et d'espèces soulignés d'un trait).

Il convient de numéroter les *tableaux* et de leur donner un titre ; les tableaux compliqués devront être préparés de façon à pouvoir être clichés comme une figure.

Les *références bibliographiques* apparaîtront selon les modèles suivants :

Bauchot, M.-L., J. Daget, J.-C. Hureau et Th. Monod, 1970. — Le problème des « auteurs secondaires » en taxionomie. *Bull. Mus. Hist. nat., Paris*, 2e sér., **42** (2) : 301-304.

Tinbergen, N., 1952. — The study of instinct. Oxford, Clarendon Press, 228 p.

Les *dessins* et *cartes* doivent être faits sur bristol blanc ou calque, à l'encre de chine. Envoyer les originaux. Les *photographies* seront le plus nettes possible, sur papier brillant, et normalement contrastées. L'emplacement des figures sera indiqué dans la marge et les légendes seront regroupées à la fin du texte, sur un feuillet séparé.

Un auteur ne pourra publier plus de 100 pages imprimées par an dans le *Bulletin*, en une ou plusieurs fois.

Une seule épreuve sera envoyée à l'auteur qui devra la retourner dans les quatre jours au Secrétariat, avec son manuscrit. Les « corrections d'auteurs » (modifications ou additions de texte) trop nombreuses, et non justifiées par une information de dernière heure, pourront être facturées aux auteurs.

Ceux-ci recevront gratuitement 50 exemplaires imprimés de leur travail. Ils pourront obtenir à leur frais des fascicules supplémentaires en s'adressant à la Bibliothèque centrale du Muséum : 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, 75005 Paris.


MUSEUM
NATIONAL
D'HIST. NAT.